



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

**Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las
ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae)**

Autora: Andrea Carolina Puma Araujo
andre28_01@hotmail.com

Tesis para optar por el Título Profesional de
QUÍMICA FARMACÉUTICA

Tutores: Dr. Eduardo Patricio Mayorga LLerena (UCE)
edmayorga@alafar.com
Dr. Guillermo Delgado Lamas (UNAM)
guillermo.delgadolamas@gmail.com

Quito, junio del 2013

Puma Araujo, Andrea Carolina (2013). Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae). Trabajo de investigación para optar por el grado de Química Farmacéutica. Carrera de Química Farmacéutica. Quito: UCE. 132 p.

DEDICATORIA

**A mis padres.
Con todo mi cariño y admiración**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, por darme una formación profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Química, por abrirme las puertas y brindarme todos los medios para la realización de la parte experimental de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Mayorga, por la asesoría brindada en la elaboración de mi tesis, por su valioso apoyo y su amistad, por guiarme en esta investigación científica: y el interés que manifiesta en la superación de sus alumnos.

A los miembros del tribunal calificador: Dr. Wilson Parra, Dr. Miguel de La Cadena, por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la tesis

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por las enseñanzas y su apoyo que me brindó para el desarrollo de la parte experimental de la tesis, por lo cual mi infinito agradecimiento.

Al Dr. Fernando Novillo, por su apoyo y por las gestiones realizadas para poder realizar este trabajo en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por su ayuda y asesoramiento en el transcurso de la parte experimental de esta tesis, sobre todo por su valiosa amistad.

A mis padres por toda su confianza y cariño, por las fuerzas de aliento de todos los días, por ser la luz de mi vida, sobre todo por su infinito amor.

A mis hermanas, Amanda y Anabel por darme sus alegrías, su apoyo y su compañía, que es lo más valioso para mí.

A mis compañeros del laboratorio 1C del Instituto de Química de la UNAM.

A mis amigos, y demás personas que hicieron muy grato este período de mi vida.

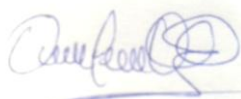
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

HOJA DE AUTORIZACIÓN DEL AUTOR
(Para su publicación, Normalizada por Procuraduría)

Yo, Andrea Carolina Puma Araujo en calidad de autora del trabajo de investigación realizada sobre “Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae)”, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, a 25 de junio del 2013



Andrea Carolina Puma Araujo

C.C. 172047603-3

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Por la presente, dejo constancia que he leído la Tesis presentado por la Señorita Andrea Carolina Puma Araujo para optar por el título profesional de Química Farmacéutica cuyo tema es “Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae)”; la misma que reúne los requerimientos, y los méritos suficientes para ser sometida a evaluación por el Tribunal Calificador.

En la ciudad de Quito, a los 25 días del mes de junio del 2013

A handwritten signature in blue ink, enclosed within a faint circular stamp. The signature appears to read 'Eduardo Patricio Mayorga Llerena'.

Dr. Eduardo Patricio Mayorga Llerena

C.C. 180150801-9



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



INFORME DEL TRIBUNAL CALIFICADOR DE LA TESIS

Quito, 25 de junio del 2013

Señor

Dr. Wilson Parra M.

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Presente.-

Señor Decano:

El tribunal encargado de calificar la Tesis “Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae), presentada por: Andrea Carolina Puma Araujo, estudiante de la Carrera de Química Farmacéutica, luego del estudio y revisión correspondiente, resolvió:

APROBAR ☒ la Tesis con la NOTA de: 20 (veinte)

REPROBAR ☐ la Tesis.

Es cuanto podemos informar.

Atentamente,

Bf. Miguel De la Cadena R.

040010748-8

Dr. Eduardo Mayorga

180150801-9

Dr. Wilson Parra

180109990-2

Lugar donde se realizó la investigación

El desarrollo experimental de la tesis “**Aislamiento y Elucidación Estructural de los Metabolitos Secundarios Presentes en las Ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae)**” se llevó a cabo en el Laboratorio 1C, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en México D.F. bajo el asesoramiento del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

CONTENIDO

	pág.
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Objetivos de la investigación	2
1.3.1. Objetivo general:	2
1.3.2. Objetivos específicos:	2
1.4. Importancia y justificación de la investigación	2
CAPITULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Fundamento Teórico.....	4
2.2.1. Familia Euphorbiaceae.....	5
2.2.1.1. Importancia de la familia Euphorbiacea	5
2.2.1.2. Perfil químico de la familia Euphorbiaceae.....	6
2.2.2. Género <i>Sebastiania</i>	8
2.2.2.2. Usos tradicionales del género <i>Sebastiania</i> spp.	14
2.2.2.3. Actividad Antifúngica y Antibacteriana del género <i>Sebastiania</i>	15
2.2.3. <i>Sebastiania longicuspis</i>	17
2.2.3.1. Descripción de la especie <i>Sebastiania longicuspis</i>	18
2.2.4. Metabolitos de las plantas	20
2.2.4.1. Terpenos	23
2.2.4.1.1. Síntesis de Terpenos	25
2.2.4.1.2. Actividades biológicas de los triterpenos:	27
2.2.4.2. Esteroles	27
2.2.4.2.1. Actividades biológicas de los esteroles	29
2.2.4.3. Compuestos fenólicos:	30
2.2.5. Criterios de selección en la búsqueda de Compuestos Bioactivos de plantas	30

2.2.6.	Métodos de Obtención de extractos a partir de plantas	33
2.2.6.1.	Métodos de extracción.....	36
2.2.6.2.	Concentración de extractos	37
2.2.7.	Métodos de purificación e identificación	37
2.2.7.1.	Filtración.....	39
2.2.7.2.	Decantación	39
2.2.7.3.	Cristalización	40
2.2.7.4.	Recristalización.....	41
2.2.7.5.	Destilación	41
2.2.7.6.	Extracción	43
2.2.7.7.	Cromatografía	46
2.2.7.7.1.	Cromatografía plana	47
2.2.7.7.2.	Cromatografía en columna.....	51
2.2.7.7.3.	Disolventes más comunes usados en cromatografía.....	54
2.2.7.7.4.	Términos empleados en cromatografía.....	55
2.2.7.8.	Espectroscopía	56
2.2.8.1.	Espectroscopía Ultravioleta (UV)	57
2.2.8.2.	Espectroscopia Infrarroja (IR)	58
2.2.8.3.	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	61
CAPITULO III		72
METODOLOGÍA.....		72
3.1.	Tipo de investigación	72
3.2.	Población y muestra	72
3.3.	Diseño Experimental	72
3.4.	Materiales y Métodos	73
3.4.1.	Material Vegetal	73
3.4.2.	Secado del material vegetal.....	74
3.4.3.	Molienda	74
3.4.4.	Maceración.....	74
3.4.5.	Eliminación de solvente	75
3.4.6.	Aislamiento y purificación.....	76
3.4.6.1.	Técnicas utilizadas para el aislamiento de metabolitos secundarios	76
3.4.6.1.1.	Cromatografía en columna	76

3.4.6.1.2. Cromatografía en capa fina (CCF).....	77
3.4.6.1.3. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP).....	78
3.4.6.2. Instrumentos	78
3.4.6.2.1. Reveladores:	78
3.4.6.2.2. Punto de fusión	79
3.4.7. Identificación de metabolitos secundarios	79
3.4.7.1. Espectroscopia Infrarroja (IR)	79
Figura 3.9. Equipo de Fisher-Johns. Utilizado en la determinación del punto de fusión.....	79
3.4.7.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	80
Se obtuvieron espectros mediante diferentes técnicas ya sea unidimensionales RMN ¹ H, RMN ¹³ C, DEPT, o bidimensionales como son: COSY, NOESY, HSQC y HMBC.....	80
3.4.7.3. Software.....	80
CAPITULO IV	82
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
4.1 Análisis y discusión de resultados.....	82
4.1.1 rendimiento de la extracción de las hojas y tallos de <i>Sebastiania longicuspis</i> ,	82
4.1.2. Perfil químico del extracto de diclorometano-metanol 1:1 de los tallos y hojas de <i>Sebastiania longicuspis</i>	82
4.1.2.1. Análisis de los metabolitos secundarios extraídos de los tallos de <i>S. longicuspis</i>	84
4.1.2.1.1. Análisis del compuesto 1 (Lupeol).....	84
4.1.2.2. Análisis de los metabolitos secundarios extraídos de las hojas de <i>S. longicuspis</i>	90
4.1.2.2.1. Análisis del compuesto 3 (Epi-taraxerol)	90
4.1.2.2.2 Análisis Compuesto 4 (Taraxerol)	93
4.1.2.2.3. Análisis del compuesto 5 (mezcla de β- sitosterol y estigmasterol).....	96
4.1.2.2.3. Análisis del compuesto 6: (ácido lignocérico)	99
CAPITULO V	101
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	101
5.1. Conclusiones	101
5.2. Recomendaciones.....	102
BIBLIOGRAFÍA	103

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 2. 1. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de extractos de <i>S. commersoniana</i>	15
Tabla 2. 2. Actividad antimicrobiana del extracto de <i>Sebastiania chamaelea</i>	16
Tabla 2.3. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna	53
Tabla 2.4. Disolventes más usados en cromatografía	54
Tabla 2.5. Espectro electromagnético	57
Tabla 2.6. Multiplicidades e Intensidades Relativas	65
Tabla 4.1. Rendimiento de la extracción de hojas y tallos	82
Tabla 4.2. Valores experimentales y teóricos de RMN ^1H para 3β -Lupeol.	85
Tabla 4.3. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C para 3β -Lupeol.	85
Tabla 4.4. Valores experimentales y teóricos de RMN ^1H para 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene	88
Tabla 4.5. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C para 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene.	88
Tabla 4.6. Valores experimentales y teóricos de RMN ^1H para 3epi-Taraxerol.....	91
Tabla 4.7. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C para 3epi-taraxerol.....	92
Tabla 4.8. Valores experimentales y teóricos de RMN ^1H para 3β -Taraxerol.	94
Tabla 4.9. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C para 3β -Taraxerol.	94
Tabla 4.10. Valores experimentales y teóricos de RMN ^1H para β -Sitosterol-estigmasterol.	98
Tabla 4.11. Datos Experimentales RMN ^1H para ácido lignocérico.	100

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 2.1. Género <i>Sebastiania</i>	9
Figura 2.2. <i>Sebastiania longicuspis</i>	17
Figura 2.3. Voucher de identificación botánica <i>Sebastiania longicuspis</i>	19
Figura 2.4. Distribución geográfica de <i>Sebastiania longicuspis</i>	20
Figura 2.5. Metabolismo secundario del carbono.	23
Figura 2.6. Biosíntesis de terpenos.	24
Figura 2.7. Estructura de algunos terpenos.	26
Figura 2.8. Esqueletos más comunes de los triterpenos y sus derivados.	26
Figura 2.9. Ruta biosintética de los esteroides	28
Figura 2.10. Proceso de obtención de extractos a partir de plantas medicinales.	34
Figura 2.11. Métodos de purificación e identificación de compuestos orgánicos utilizados en productos naturales.	38
Figura 2.12. Filtración.	39
Figura 2.13. Decantación	39
Figura 2.14. Equipos de destilación.	43
Figura 2.15. Rotavapor.	45
Figura 2.16. Equipo Soxhlet.	46
Figura 2.17. Cromatografía en papel.	47
Figura 2.18. Cromatografía en capa fina.	48
Figura 2.19. Cámaras para el desarrollo de cromatografía en capa fina	49
Figura 2.20. Equipo de emisión de radiación de luz UV	50
Figura 2.21. Cromatografía en columna.	52
Figura 2.22. Elección de un disolvente para cromatografía en capa fina.	55
Figura 2.23. Región infrarroja del espectro electromagnético.	58
Figura 2.24. Tipos de vibraciones moleculares.	59
Figura 2.25. Bandas de absorción IR de interés.	60
Figura 2.26. Acoplamiento con un núcleo.	61
Figura 2.27. Interacción espín-espín.	62

Figura 2.28. Acoplamiento con dos núcleos químicamente equivalentes	63
Figura 2.29. Acoplamiento con tres núcleos químicamente equivalentes.	63
Figura 3.1. Técnicas e instrumentos analíticos	73
Figura 3.2. Disminución del tamaño de partícula del material vegetal	74
Figura 3.3. Preparación de los extractos crudos.	75
Figura 3.4. Eliminación del solvente en rotavapor.	75
Figura 3.5. Columna cromatográfica	76
Figura 3.6. Extracto en polvo de las hojas de <i>S. longicuspis</i>	77
Figura 3.7. Cromatografía en capa fina.	78
Figura 3.8. Revelador de cromatoplas.	79
Figura 3.9. Equipo de Fisher-Johns. Utilizado en la determinación del punto de fusión.	79
Figura 3.10. Equipos de IR y RMN.	80
Figura 3.11. Software para el análisis de estructuras químicas	81
Figura 4.1. Esquema de fraccionamiento del extracto diclorometano-metanol 1:1 de los tallos de <i>S. longicuspis</i>	82
Figura 4.2. Esquema de fraccionamiento del extracto diclorometano-metanol 1:1 de las hojas de <i>S. longicuspis</i>	83
Figura 4.3. Singuletes en el espectro de RMN- ¹ H de 3 epi-taraxerol	90
Figura 4.4. Resonancia de los protones más sobresalientes de RMN ¹ H del epi-taraxerol	91

LISTA DE ANEXOS

pág.

ANEXO I. Espectros de los compuestos aislados de los tallos del extracto diclorometano-metanol	
1:1 de <i>Sebastiania longicuspis</i>	107
Espectro 1. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 19 β-lupeol	108
Espectro 2. IR de 19 β-lupeol	109
Espectro 3. RMN ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃) de 19 β-lupeol	110
Espectro 4. RMN DEPT 90 (300 MHz, CDCl ₃) de 19 β-lupeol	111
Espectro 5. RMN DEPT 135 (300 MHz, CDCl ₃) de 19 β-lupeol	112
Espectro 6. COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 19 β-lupeol	113
Espectro 7. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 3-oxo-21β-H-hop-22(29)-ene (32)	114
Espectro 8. RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) de 3-oxo-21β-H-hop-22(29)-ene (32)	115
Espectro 9. DEPT 90 (400 MHz, CDCl ₃) de 3-oxo-21β-H-hop-22(29)-ene (32)	116
Espectro 10. DEPT 135 (400 MHz, CDCl ₃) de 3-oxo-21β-H-hop-22(29)-ene (32)	117
ANEXO II. Espectros de los compuestos aislados de las hojas del extracto diclorometano-metanol	
1:1 de <i>Sebastiania longicuspis</i>	118
Espectro 11. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 3-epi-taraxerol	119
Espectro 12. RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de 3-epi-taraxerol	120
Espectro 13. DEPT 90 (500 MHz, CDCl ₃) de 3-epi-taraxerol	121
Espectro 14. DEPT 135 (500 MHz, CDCl ₃) de 3-epi-taraxerol	122
Espectro 15. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de taraxerol	123
Espectro 16. RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de taraxerol	124
Espectro 17. DEPT 90 (500 MHz, CDCl ₃) de taraxerol	125
Espectro 18. DEPT 135 (500 MHz, CDCl ₃) de Taraxerol	126
Espectro 19. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de β- sitosterol-Estigmasterol	127
Espectro 20. RMN ¹³ C (500 MHz, CDCl ₃) de β- sitosterol-Estigmasterol	128
Espectro 21. DEPT 90 (500 MHz, CDCl ₃) de β- sitosterol-Estigmasterol	129
Espectro 22. DEPT 135 (500 MHz, CDCl ₃) de de β- sitosterol-Estigmasterol	130
Espectro 23. COSY (500 MHz, CDCl ₃) de de β- sitosterol-Estigmasterol	131
Espectro 24. Espectro 18. RMN 1H (500 MHz, CDCl ₃) de Ácido lignocérico	132

RESUMEN DOCUMENTAL

En el presente trabajo se realizó con el fin de aislar y caracterizar los constituyentes fitoquímicos del extracto diclorometano-metanol 1:1 de los tallos y de las hojas de la planta *Sebastiania longicuspis*, perteneciente a la familia Euphorbiaceae, con el objetivo de contribuir al conocimiento químico de esta especie por medio de la utilización de diversos métodos convencionales de cromatografía y la elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó con técnicas espectroscópicas sobre la base de los datos espectrales (IR, ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY) y mediante la comparación con muestras auténticas.

Esta investigación permitió la caracterización de los siguientes compuestos: lupeol y 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene a partir de los tallos y 3-epi-taraxerol, taraxerol, mezcla de β -sitosterol, estigmasterol y ácido lignocérico, a partir de las hojas.

Los resultados sugieren que la planta de *Sebastiania longicuspis* podría tener actividad antiinflamatoria debido a la presencia de estos metabolitos secundarios.

Palabras clave: *Sebastiania longicuspis*, Euphorbiaceae, IR, RMNA ^1H , RMN ^{13}C , DEPT, COSY lupeol, 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene, 3-epi-taraxerol, taraxerol, β -sitosterol-estigmasterol, ácido lignocérico

ABSTRACT

This study was conducted to isolate and characterize the phytochemical constituents of the extract dichloromethane- methanol 1:1 of the stems and leaves of the plant *Sebastiania longicuspis*, belonging to the family Euphorbiaceae, with the aim of contributing to chemical knowledge of this specie through the use of various conventional methods of chromatographic and structural elucidation for obtaining compounds was performed using spectroscopic techniques on the base of spectral data (IR, ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY) and by comparing with authentic samples.

This investigation allowed the characterization of the following compounds: lupeol and 3-oxo-21 β -H-hop-22 (29)-ene from the stems, and 3-epi-taraxerol, taraxerol, β -sitosterosterol, stigmasterol mixture and lignoceric acid, to from the leaves.

The results suggest that the plant *Sebastiania longicuspis* could have antiinflammatory activity due to the presence of these secondary metabolites.

Key words: *Sebastiania longicuspis*, Euphorbiaceae, IR, NMR ^1H , RMN ^{13}C , DEPT, COSY lupeol, 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene, 3-epi-taraxerol, taraxerol, β -sitosterol-stigmasterol, lignoceric acid

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

En diferentes lugares del mundo se utilizan un gran número de especies vegetales con fines diversos, este hecho ha motivado que numerosos grupos de investigación realicen estudios sobre la flora útil con el fin de generar conocimientos tendientes al aprovechamiento racional de este recurso natural renovable, que es la vegetación.

Las plantas superiores han constituido un recurso importante de la medicina tradicional que se practica desde la antigüedad por diferentes culturas en el mundo, como resultado de estas prácticas, se ha generado conocimiento sobre el uso y manejo de ciertas plantas con el fin de mantener la salud y prevenir, mejorar o tratar padecimientos físicos o mentales que han aquejado a la humanidad.

El uso de ciertas plantas en la medicina tradicional se sustenta en el conocimiento acumulado de las culturas indígenas y sugiere que éstas contienen sustancias bioactivas, con una amplia variedad de estructuras químicas complejas que han mostrado diferentes actividades biológicas relevantes. Una parte significativa de estos productos naturales han sido la base para el desarrollo de nuevos fármacos. Por otro lado, existen especies que todavía no se han estudiado, por lo que es necesario realizar el estudio químico de este grupo de plantas.

En particular, la planta *Sebastiania longicuspis* (nombre común: chechén blanco) perteneciente a la familia Euphorbiaceae, es apreciada en México por su uso medicinal por varios grupos étnicos del sur del país.

La investigación química de varias especies vegetales que integran a la familia Euphorbiaceae, han demostrado que presenta una gran diversidad estructural de metabolitos secundarios que han sido aislados y caracterizados, tales como sesqui-, di- y triterpenos, flavonoides, alcaloides y acetogeninas, entre otros, (Duarte, et al., 2007); con lo que se ha conseguido reconocer la importancia química y biológica de esta familia; pero existen especies vegetales que todavía no se han estudiado, como es el caso de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae), por lo que es pertinente realizar una investigación química a través de la identificación de los constituyentes químicos presentes en los extractos vegetales

de esta especie, y así poder lograr hallazgos significativos en el descubrimiento de metabolitos secundarios importantes.

1.2. Formulación del problema

Por la falta de información de los constituyentes químicos presentes en la planta *Sebastiania longicuspis*, se hace imprescindible realizar una investigación para encontrar y determinar la estructura de los metabolitos secundarios presentes en el extracto diclorometano:metanol (1:1) de las ramas (tallos y hojas) de esta especie vegetal, en esta investigación se formula el problema en los siguientes términos: ¿Cuáles son las estructuras de los metabolitos secundarios aislados del extracto de las ramas de *Sebastiania longicuspis* en diclorometano:metanol (1:1)?.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general:

Aislar y Elucidar las estructuras de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae).

1.3.2. Objetivos específicos:

- Compilar información química y biológica referente a las especies pertenecientes al género *Sebastiania* de la familia Euphorbiaceae.
- Aislar y purificar los compuestos presentes en el extracto diclorometano-metanol (1:1) de las ramas de *S. longicuspis* mediante la aplicación de técnicas cromatográficas y de cristalización.
- Identificar y elucidar las estructuras moleculares de los compuestos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas.
- Integrar los resultados al contexto del conocimiento de los productos naturales presentes en el género *Sebastiania* y en la familia Euphorbiaceae.

1.4. Importancia y justificación de la investigación

El ser humano en todas las culturas del mundo ha adquirido conocimiento empírico sobre el uso de las plantas con diversos propósitos, tales como alimenticio, agronómico, medicinal, entre otros.

El estudio de los constituyentes químicos a partir de la naturaleza constituye una línea de investigación que se cultiva en todo el mundo dirigido al descubrimiento de nuevas sustancias que pueden tener alguna actividad biológica.

La familia Euphorbiaceae es importante económicamente, ya que numerosas especies de este grupo se cultivan por su uso industrial (ej. *Ricinus communis* y *Hevea brasiliensis*), alimenticio (ej. *Manihot esculenta*) y ornamental (ej. *Euphorbia pulcherrima*).

Algunas plantas de esta familia se conocen por sus propiedades tóxicas, irritantes a mucosas y piel e inductoras de tumores e inflamación. Esta familia se caracteriza por la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos diterpénicos con diferentes tipos de esqueleto que presentan actividades biológicas importantes; dentro de estos, los de tipo tigliano, ingenano y dafnano provocan irritación en la piel y promueven la formación de tumores, y los de tipo latirano y jatrofano han mostrado potente actividad antitumoral.

Considerando la diversidad estructural de los productos naturales bioactivos aislados de la familia Euphorbiaceae, se propone realizar investigaciones concernientes al descubrimiento de sustancias naturales en la especie *S. longicuspis*.

Sebastiania longicuspis se utiliza en la preparación de infusiones de las partes aéreas, que se administra para el tratamiento de dolores de cabeza y para la hipertensión; por lo que estos datos sugieren la posibilidad de que esta especie vegetal biosintetice metabolitos secundarios bioactivos, lo que se hace necesario su estudio químico minucioso. Previamente no se ha realizado estudio químico alguno, por lo que esta investigación es el primer aporte al conocimiento científico de esta especie.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Todas las civilizaciones han proporcionado evidencia del uso de las plantas para tratar diversos padecimientos (Phillipson, 2001); aunque el estudio sistemático de los constituyentes bioactivos es relativamente creciente.

El aislamiento e identificación estructural de los principios activos de las plantas se dio a principios del siglo XIX, y con el desarrollo de la química, se proporcionó un paso clave en el mundo de los medicamentos: el aislamiento de los principios activos. Friedrich Sertürner hizo un estudio del opio aislando la morfina, la cual se comercializó por primera vez en 1817; así como Pelletier y Caventou, con la obtención de la quinina en 1820 lograron los avances más significativos y a partir de entonces se han caracterizado varios cientos de miles de productos naturales, y la mayoría de ellas fue determinada solo hasta mediados del siglo XX. (Gómez, 2006)

[Los organismos vivos son capaces de biosintetizar una amplia variedad de compuestos denominados metabolitos secundarios que generalmente no son esenciales en los procesos metabólicos de la planta. Se cree que la diversidad de estos metabolitos es consecuencia del proceso evolutivo de las plantas para mejorar su defensa contra microorganismos, hongos, insectos y algunos herbívoros.] (Dixon, 2001).

Es notable que el avance en los procedimientos de purificación, elucidación estructural y la implementación de bioensayos específicos, han favorecido el descubrimiento de metabolitos secundarios, y estos a su vez permiten el descubrimiento de sustancias bioactivas de interés terapéutico.

2.2. Fundamento Teórico

Se describen a continuación las características de la familia Euphorbiaceae, así como también la clasificación y descripción taxonómica de *Sebastiania longicuspis*

2.2.1. Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes a nivel mundial y ocupa el sexto lugar en diversidad entre las angiospermas después de las Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Rubiaceae. Se divide en cinco subfamilias: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Euphorbioideae, Crotonoideae, Acalyphoideae. Está constituida aproximadamente por 8,700 especies incluidas en 320 géneros que se distribuyen en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de los hemisferios norte y sur.

Las euforbiáceas son dicotiledóneas, con grandes variaciones morfológicas, lo que dificulta su caracterización botánica; sin embargo, la mayoría de las especies se reconocen por sus flores unisexuales, frecuentemente pequeñas, la presencia de un disco floral, un ovario súpero con 3 lóculos y frutos típicamente esquizocárpicos capsulares; además, muchas especies tienen hojas con estípulas y varias formas de glándulas, los frutos son generalmente de tres cápsulas unicelulares, cada célula contiene una sola semilla de la que se puede obtener los aceites de semilla tóxicos en algunas especies.

Muchas de ellas contienen un jugo lechoso que puede ser tóxico, especialmente para animales de sangre fría, y puede producir una dermatitis similar a la de la hiedra venenosa.

Algunas de las especies de Euphorbiaceae son tóxicas con efectos purgantes o en ocasiones alérgicas. Estas propiedades pueden dificultar la investigación química de las mismas, ya que se requieren medidas especiales para su manipulación; sin embargo, dichas propiedades a su vez han despertado el interés en la exploración de metabolitos novedosos biosintetizados por especies de esta familia.

En la República Mexicana la flora vascular está calculada en 22,000 especies, dentro de estas, la familia Euphorbiaceae contribuye con el 3% (782 especies ubicadas en 43 géneros). Los miembros de esta familia pueden crecer como plantas herbáceas anuales, hierbas perennes, geófitas, arbustos, árboles y bejucos. Los géneros mexicanos que cuentan con el mayor número de especies son: *Euphorbia* con 241, *Croton* con 124, *Acalypha* con 108, *Jatropha* con 48 y *Phyllanthus* con 41, juntos representan el 72% de las especies de Euphorbiaceae en México. (Reyes, 2012)

2.2.1.1. Importancia de la familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae es una de las más importantes desde el punto de vista económico ya que muchos de sus miembros se cultivan por su uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental; por

ejemplo, *Manihot esculenta* (yuca), *Ricinus communis* (aceite de ricinio), *Hevea brasiliensis* (Hule natural o caucho), *Euphorbia pulcherrima* (Noche buena), entre otros, (Steinmann, 2002)

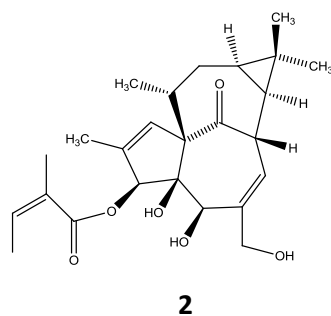
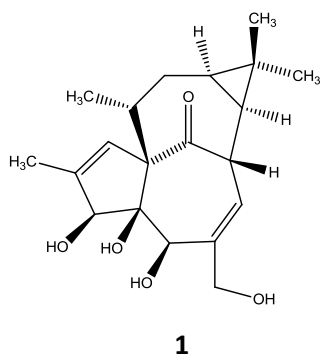
Dentro de las aplicaciones tradicionales de las Euphorbiaceae, se distingue su uso para dolores abdominales, antihistamínico, afrodisíacos, bronquitis, diabetes, enemas y enfermedades urinarias entre otras, a continuación se presenta una lista de los usos más comunes en medicina tradicional de algunas especies de la familia Euphorbiaceae (Salamanca, 2002)

Uso	Especies
Dolor abdominal	<i>Antidesma venosum</i> ;
Antibortiva	<i>Bridelia micrantha</i> Hochst. <i>Alchornea cordifolia</i> Müll.Arg.
Antiasmática	<i>Croton</i> spp.; <i>Euphorbia</i> spp., <i>Jatropha gossypifolia</i> L.; <i>Ricinus communis</i> L.
Antibióticos	<i>Acalypha wilkesiana</i> Muell. Arg.; <i>Croton sellowii</i> Baill; <i>Euphorbia</i> spp. <i>Flueggea virosa</i> Baill; <i>Sauropus rostratus</i> Miq.
Anticancerígena	<i>Croton</i> spp. <i>Euphorbia</i> spp.
Bronquitis	<i>Euphorbia</i> spp.
Anticonceptivo	<i>Mallotus philippensis</i> Muell

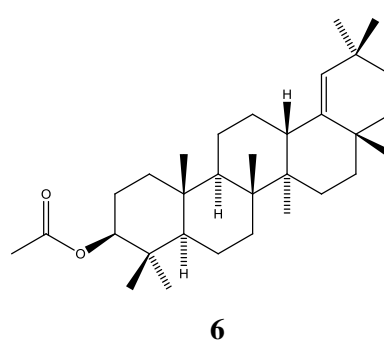
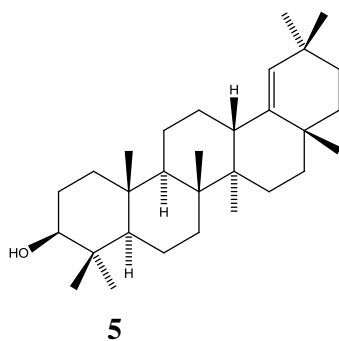
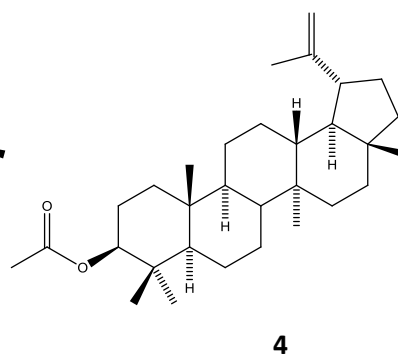
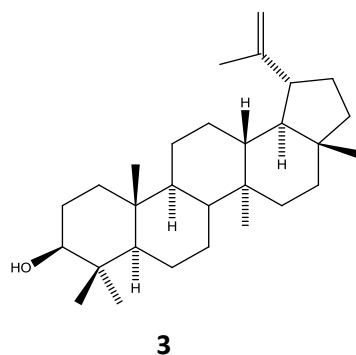
2.2.1.2. Perfil químico de la familia Euphorbiaceae

Un gran número de terpenoides se han aislado a partir de plantas de la familia Euphorbiaceae de los cuales es notable que algunos de los compuestos son destacados por sus propiedades terapéuticas o tóxicas, presenten estructuras del tipo diterpeno. (Jasbbi, 2006).

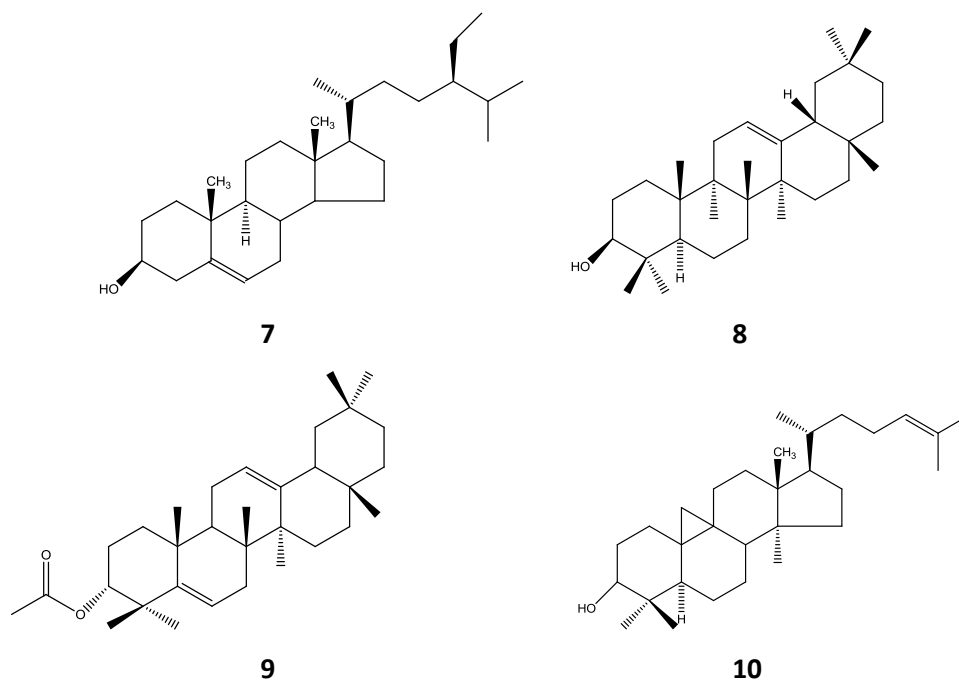
En estudios farmacológicos los diterpenos de euporbiáceas exhiben actividad biológica de diversos tipos, demostrando ser fármacos potenciales y también metabolitos tóxicos útiles para el estudio de padecimientos tales como los procesos de inflamación o la generación de tumores; en algunas ocasiones estos compuestos están relacionados biogenética o estructuralmente, por ejemplo, el ingenol (**1**) y derivados producidos por *Euphorbia esula* pueden ser tóxicos para los herbívoros (Halaweish, Kronberg, Hubert, & Rice, 2002), mientras que el derivado 3-angelolo de ingenol (**2**) aislado de *Euphorbia plepus* demuestra actividad antileucémica y antitumoral; es importante señalar que este producto natural se encuentra en etapa de pruebas clínicas para tratamiento de queratosis actínica (neoplasia precancerosa de la piel) (Kirby et al. 2010).



En cuanto a triterpenos aislados de Euforbiáceas, se han encontrado a partir del género *Cnidoscolus* spp.: lupeol (**3**), acetato de lupeilo (**4**), germanicol (**5**) y 3-acetato de germanilo (**6**) (Delgado, Hernández, & Aguilar, 1994)



Entre los componentes de látex de estas plantas se han encontrado otros triterpenos, por ejemplo de *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) se aislaron β -sitosterol (**7**), β -amirina (**8**), acetato de β -amirina (**9**), germanicol (**5**), 3- β -acetilgermanicol (**6**) y cicloartenol (**10**).



En cambio en otras especies del género *Euphorbia*, los principios activos del látex con efecto irritante y que algunos han mostrado actividad carcinogénica en piel de ratón, son principalmente, ésteres de forbol, ingenos y sus derivados (Roe & Peirce, 1961).

Los ésteres de forbol son frecuentes en especies de la familia Euphorbiaceae, siendo característicos aquellos que contienen un átomo de nitrógeno en su estructura (Goel et al. 2007). Se ha informado la presencia de forboles tóxicos en diversas especies como *Sapium indicum*, *S. japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *E. crocuescence*, *E. ticulli*, *Croton spareiflorus*, *C. tiglium*, *C. ciliatoglandulifer*, *Jatropha curcas*, *Excoecaria agallocha* y *Homalanthus nutans* (Beutler et al. 1989).

2.2.2. Género *Sebastiania*

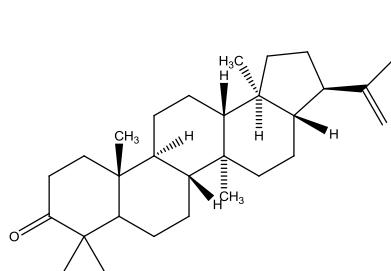
Son subarbustos o arbustos, rara vez hierbas o árboles, comprende cerca de 100 especies.

Sebastiania spp. Es un género propio de áreas tropicales y cálidas (Burger, 1995).

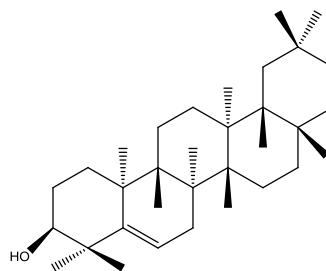
Es originario de Sudamérica, pocas especies se distribuyen en el sureste de Asia, Australia, Centro América, Brasil y México. (Webster, 1994)

En la figura 2.1. se observan dos especies significativas de este género, ambas originarias de Sudamérica.

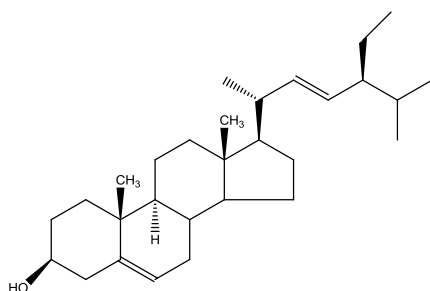




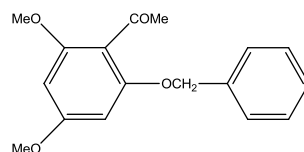
11



12

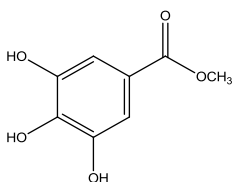


13

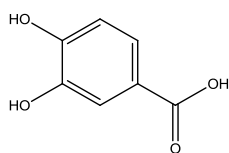


14

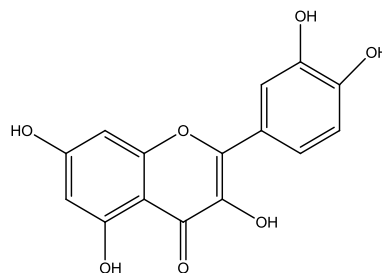
Sebastiania brasiliensis: Penna et al. (2001) realizaron un estudio del extracto hidroalcohólico al 50% de *S. brasiliensis*, en el cual se identificaron dos compuestos antimicrobianos: metilgalato (**15**) (CMI 128 mg / ml) y ácido protocatéquico (**16**) (CMI 128 mg / ml); se aislaron también quercetina (**17**), kaempferol (**18**), quercitrina (**19**) y ácido gálico (**20**).



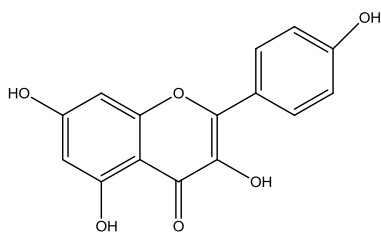
15



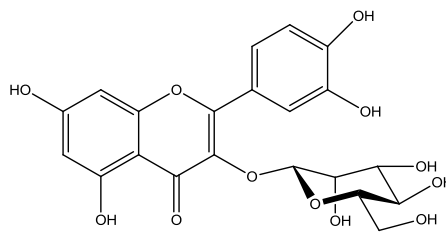
16



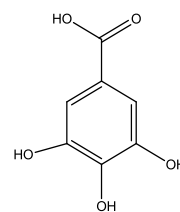
17



18

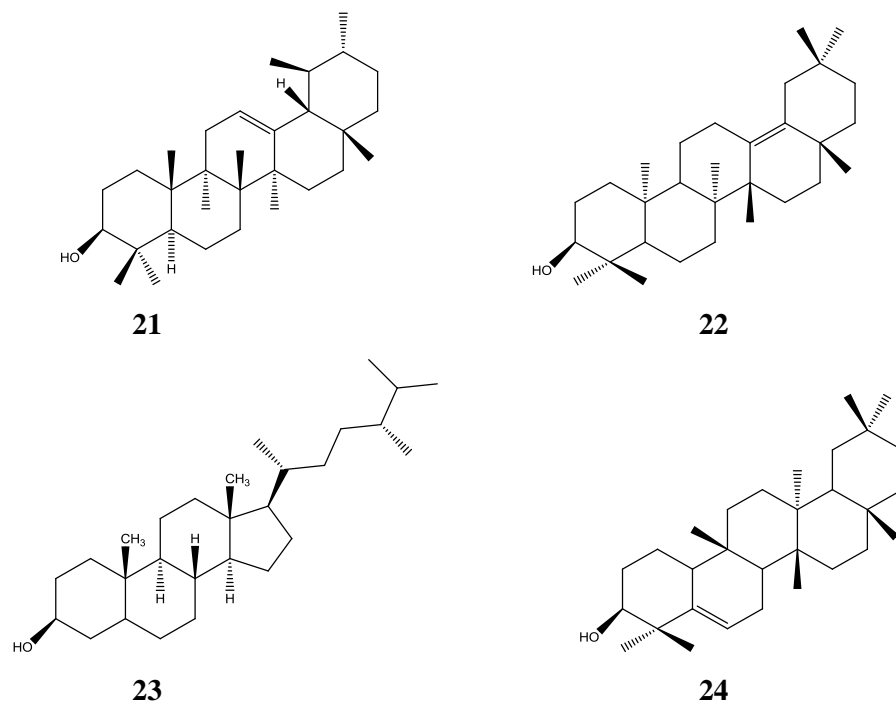


19

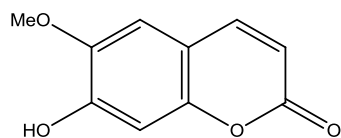


20

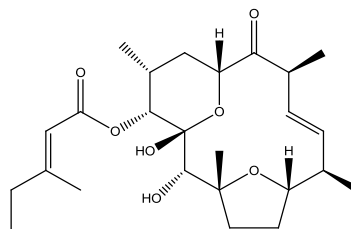
***Sebastiania argutidens*:** Según Branco y Pizzolatti (2002, pp.17-19) la columna de fraccionamiento con SiO₂ del extracto de hexano *Sebastiania argutidens* produjo fracciones que contienen hidrocarburos, ácidos carboxílicos, esteroides y triterpenos pentacíclicos: lupeol (**3**), glutinol (**12**), α -amirina (**21**), β -amirina (**8**), olean-13(18)-en-3-ol (**22**), moretenona (**11**). Además, una fracción mostró la presencia de ésteres metílicos, incluyendo cuatro ésteres de cadena larga como componentes menores. La caracterización de estos componentes químicos se ha realizado por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC). También se identificaron campesterol (**23**), estigmasterol (**13**), β -sitosterol (**7**), glutin-5-en-3-ol (**24**) por HRGC. (Branco & Pizzolatti, 2002)



***Sebastiania macrocarpa* Muell:** La investigación química del extracto de metanol de la parte aérea de *Sebastiania macrocarpa* realizada por Lima, Arriaga, y Neto (2009), permitió el aislamiento de la mezcla de esteroides β -sitosterol (**7**) y estigmasterol (**13**), ácido gálico (**20**), y escopoletina (**25**). El extracto hexánico de las raíces permitió el aislamiento del triterpeno lupeol (**3**) y del diterpeno macrocíclico (+)-tonantzitlolona (**26**). Las estructuras de todos los compuestos aislados fueron identificadas sobre la base de sus datos espectrales y por comparación de sus datos espectrales con los valores descritos en la literatura.

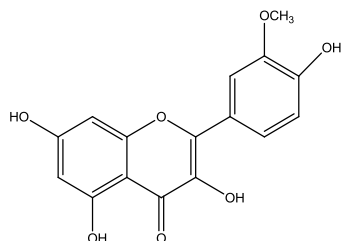


25

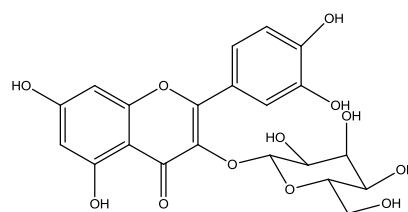


26

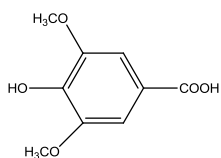
***Sebastiania Commersoniana* Baill:** Hnatyszyn et al. (2007), efectuaron un estudio en base del extracto etanólico al 50% y luego realizaron el fraccionamiento del extracto, identificaron cuatro flavonoides: quercetina (**17**), kaempferol (**18**), isorhamnetina (**27**), isoquercitrina (**28**), cuatro derivados fenólicos: ácidogálico (**20**), ácido sirínico (**29**), y ácidos caféico (**30**), y la cumarina: escopoletina (**25**). Las estructuras de los compuestos aislados fueron establecidas por métodos espectroscópicos y se confirmó por comparación con muestras de referencia y los datos de la literatura. El extracto además exhibió actividad antifúngica significativa contra *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*



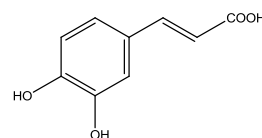
27



28



29

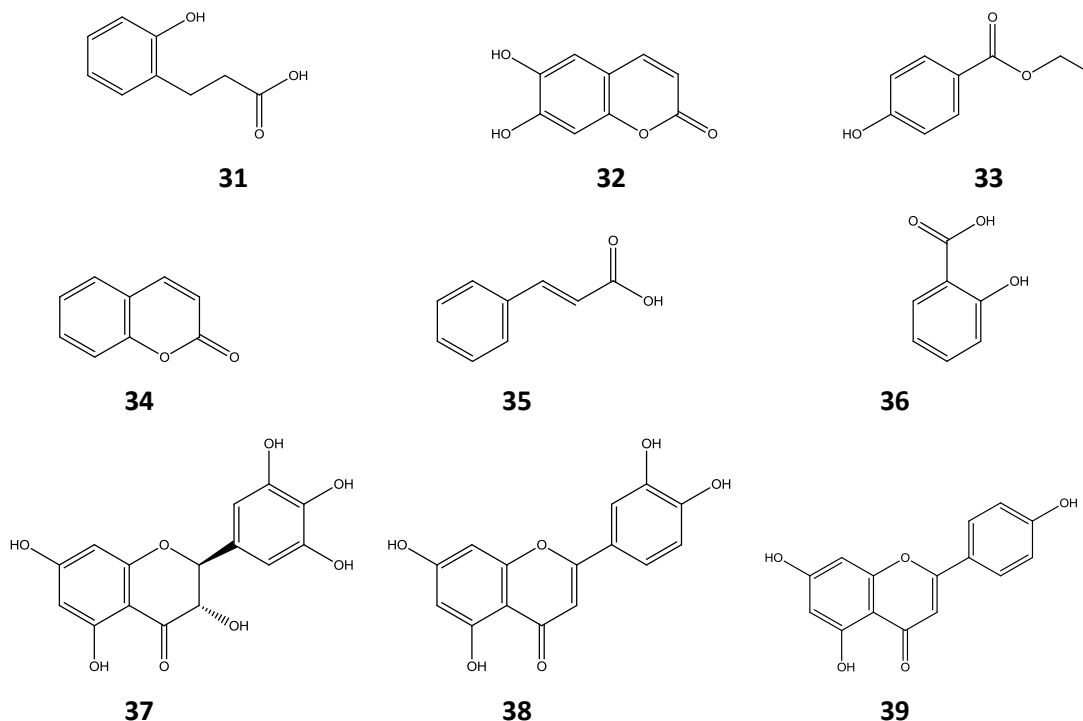


30

***Sebastiania chamaelea*:** Sree (2010) sostuvo que las hojas de *S. chamaelea* contienen un número de compuestos fitoquímicos medicinalmente importantes. El tamizaje fitoquímico preliminar reveló la presencia de los compuestos fenólicos: ácido caféico (**30**), ácido Melilótico (**31**), Aesculetina (**32**),

ácido p-hidroxibenzoico (**33**), cumarina (**34**), ácido cinámico (**35**), ácido salicílico (**36**) y escopoletina (**25**), además, los flavonoides: mirecetina (**37**), quercetina (**17**), kaempferol (**18**), luteolina (**38**) y apigenina (**39**).

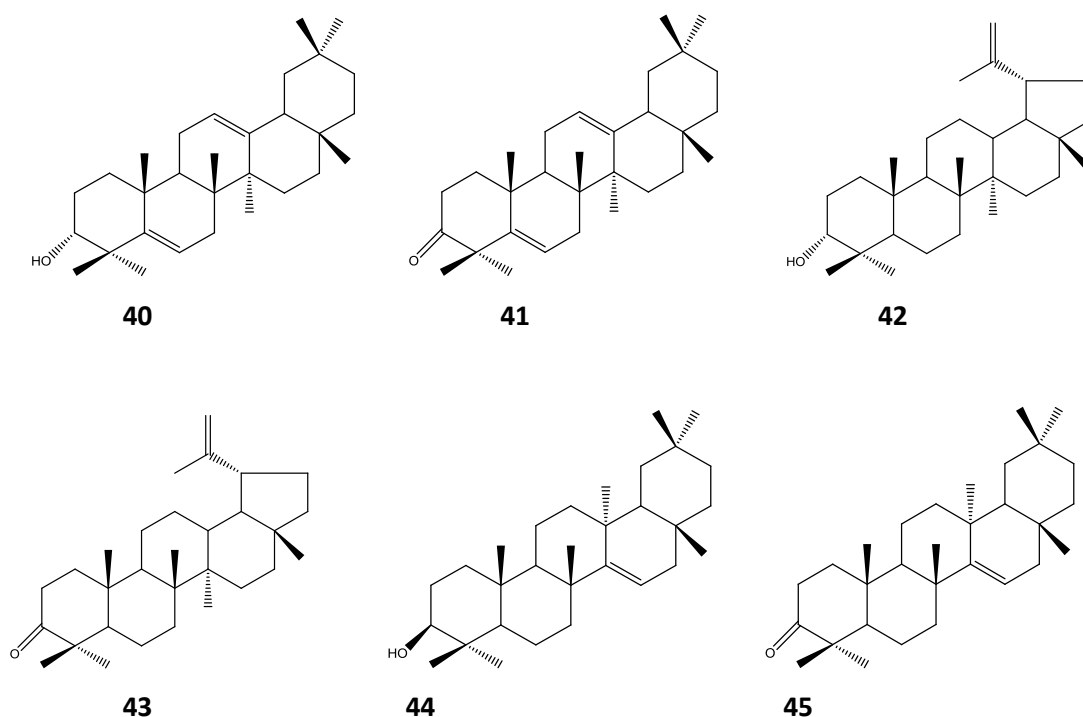
También demostró la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la hoja de *S.chamaelea* contra bacterias patógenas como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) y *Escherichia coli* y *Pseudomonas aruginosa* (gram negativas) el cual mostró una inhibición dependiente de la concentración de *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aruginosa* y *Escherichia coli*.



Sebastiania jacobinensis: un estudio realizado por Vaz et al. (2010) aisló una lectina a partir de la corteza utilizando una combinación de precipitación con acetona, fraccionamiento de sulfato de amonio, intercambio iónico y cromatografías de filtración en gel. Esta lectina inhibe el crecimiento micelial de *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum*, con un valor de IC₅₀ de $123 \pm 0,5$ y $303 \pm 0,9$ μg , respectivamente. *Artemia salina* Leach y embriones de *Biomphalaria labrata* no se ven afectados por la lectina, lo que indica la toxicidad ambiental baja.

Sebastiania adenophora: Macías et al. (2007) aislaron seis triterpenos pentacíclicos conocidos que poseen esqueleto tipo oleanano, lupano, y taraxerano; informados por primera vez en este género, a partir de las hojas de *Sebastiania adenophora* (Euphorbiaceae). Estos compuestos fueron: 3-epi- β -amirina (**40**), β -amyrinona (**41**), 3-epi-lupeol (**42**), lupenona (**43**), taraxerol (**44**) y taraxerona (**45**);

Determinaron las estructuras por comparación con datos de la literatura. Las bioactividades de estos compuestos se ensayaron en las raíces de *Amaranthus hypochondriacus*, amaranto (Amaranthaceae), *Lycopersicon esculentum*, tomate (Solanaceae), y *Echinochloa crus-galli*, hierbas gramíneas (Poaceae). Los seis triterpenos fueron selectivamente bioactivos. Un importante efecto estimulante se observó en el crecimiento de la raíz de amaranto (23% a 56%) para casi todos los triterpenos probada (250 µg/ml). Estos triterpenos inhibió significativamente el crecimiento de las raíces de hierbas gramíneas (28% a 78%) y tomate (23% a 49%). El lixiviado acuoso y los extractos orgánicos de las hojas de *S. adenophora* inhibieron significativamente el crecimiento de las raíces de todas las especies de prueba. El posible papel ecológico de los aleloquímicos aislados actualmente se discute.



2.2.2.2. Usos tradicionales del género *Sebastiania* spp.

El género *Sebastiania* spp. se conoce para el tratamiento de enfermedades tales como infecciones respiratorias, enfermedades venéreas, dolor de muelas, reumatismo, úlceras, tos, y heridas.

A continuación se describen las especies más importantes del género, así como su aplicación en la medicina tradicional:

- ***Sebastiania commersoniana*:** Su decocción es antiséptico de uso externo; el látex extirpa verrugas y calma dolores de caries dentales. (Grandi et al. 2010)

- ***Sebastiania brasiliensis*:** Su madera es muy utilizada en carpintería y construcciones rurales, además es muy buen carbón. (Carrere, 1990); también se le asignan propiedades para calmar el dolor de muelas y dientes, lo cual constituye un valor apreciado en el campo, cuando no se tiene acceso a la medicina moderna ni a las farmacias. (Haene & Aparicio, 2004)
- ***Sebastiania klotzschiana*:** Se le asignan las mismas propiedades que *Sebastiania brasiliensis* (Carrere, 1990).
- ***Sebastiania chamaelea*:** La decocción de las hojas es usado como antibiótico, sobre todo para curar heridas externas. (Carrere, 1990)

2.2.2.3. Actividad Antifúngica y Antibacteriana del género *Sebastiania*

A continuación se resumen dos estudios que han sido realizados para determinar la actividad farmacológica de las siguientes especies del género *Sebastiania*:

Sebastiania commersoniana

El extracto etanólico fue sometidos al test de actividad antifúngica frente a levaduras, hongos dermatofitos y hialohyphomycetos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.1. Los extractos ensayados fueron activos sólo contra dermatofitos con CIMs entre 100 y 500 mg/ml. Estos resultados se suman nuevas pruebas sobre la actividad antimicrobiana encontrada por Penna et al. (2001) y proporcionan una base científica para el uso tradicional de esta planta medicinal como antiséptico externo. (Hnatyszyn et al., 2007, p. 404-406)

Tabla 2. 1. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de los extractos de *S. commersoniana*.

Extracto	Microorganismos										
	C.a.	C.t.	S.c.	Cr.n.	A.fu.	A.fl.	A.n.	M.g.	M.c.	T.m.	T.r
50% EtOH	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	250	n.t.	100	250
CH ₂ Cl ₂	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	250	n.t.	250	250
Et ₂ O	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	500	n.t.	250	250
EtOAc	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	500	n.t.	500	250
Ácido gálico	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	125	250	250
Terbinafina	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0.006	0.01	0.006	0.03
Anfotericina B	1.0	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	0.125	0.75	0.075	0.075

Nota: Se evaluó ácido gálico aislado de todos los extractos activos; 50% EtOH, extracto acuoso de etanol; CH₂Cl₂, extracto en diclorometano; Et₂O, extracto en etil eter ; EtOAc, extracto en etil acetato; n.a., no activo; n.t., no probado; C.a., *Candida albicans* ATCC 10231; C.t., *Candida tropicalis* C 131; S.c., *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; Cr.n., *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264; A.fu., *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934; A.fl., *Aspergillus flavus* ATCC 9170; A.n., *Aspergillus niger* ATCC 9029; M.g., *Microsporium gypseum* C115; M.c., *Microsporium canis* C 112; T.m., *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972; T.r., *Trichophyton rubrum* C 113. (los valores de CMI están dados en mg/ml). Adaptado de: Hnatyszyn, O., Juárez, S., Ouviaña, A., et al., (2007). Phytochemical Analysis and Antifungal Evaluation. En: *Pharmaceutical Biology* , p. 405.

La presencia de ácido gálico en todos los extractos activos sugiere que podría jugar un rol muy importante en la actividad antifúngica. Previamente se ha demostrado que el ácido gálico y sus n-alquil ésteres exhibieron actividades antimicrobianas.

Sebastiania chamaelea

Sree (2010) realizó un estudio de actividad antibacteriana in vitro del extracto metanólico de las hojas mediante la técnica de difusión de disco en agar, se analizó frente a cuatro cepas bacterianas, muestra la concentración dependiente de la inhibición más o menos linealmente (Tabla 2.2); sin embargo, *B. subtilis* y *E. coli* se encontraron ser más susceptibles en comparación con *P. aruginosa*. La inhibición por el extracto fue bastante equivalente a la de la gentamicina, a razón de 10 µg / disco. Inhibición similar contra *S. epidermidis* también ha sido informada (Parekh et al., 2005).

Tabla 2. 2. Actividad antimicrobiana del extracto se *Sebastiania chamaelea*

Nombre de la bacteria	Diámetro de la zona de inhibición (mm) Metanol			
	I / 5 mg	II / 10 mg	III / 15 mg	IV / 20 mg
<i>Bacillus subtilis</i>	16,6 ± 0,94	18,0 ± 0,0	20,0 ± 1,63	23,3 ± 0,94
<i>Escherichia coli</i>	17,3 ± 0,94	19,3 ± 1,88	20,6 ± 0,94	23,3 ± 0,94
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,6 ± 0,94	18,0 ± 0,0	18,0 ± 0,0	19,3 ± 0,94
<i>Pseudomona aruginosa</i>	18,6 ± 2,4	18,0 ± 1,6	18, 6 ± 0,94	19, 3 ± 1,8

Nota: Los valores son la media de triplicados, ± DS; 5mg/disco, II : 10mg/disco, III: 15mg/disco, IV: 20mg/disco. Por: Sree, S. (2010). Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: sebastiana chamalea muell. En: *The Bioscan* , 173-175.

Las bacterias gram negativas se conocen por ser más resistentes debido al espesor de sus capas de mureína en su membrana exterior, la cual previene la entrada de sustancias inhibidoras en la célula. Esta es la razón por qué los estudios que implican pruebas de eficacia de extractos de plantas contra las bacterias muestran resultados positivos principalmente contra bacterias gram positivas.

En los últimos años múltiples cepas bacterianas resistentes, han aumentado de manera espectacular y por lo tanto el tratamiento de varias infecciones ha llegado a ser muy difícil, reduciendo las opciones terapéuticas.

Este estudio sugirió que la acción terapéutica de la planta no puede ser debido a un único compuesto, sino a la acción sinérgica de un número de compuestos. Este efecto sinérgico podría contrarrestar la resistencia de las bacterias que son difíciles de matar por un único antibiótico, por lo tanto, es la clave para curar los trastornos de la salud debido a las infecciones microbianas.

2.2.3. *Sebastiania longicuspis*

Sebastiania longicuspis, Standl conocida como Chechén blanco, figura 2.2, pertenece a la familia Euphorbiaceae. El estudio de las especies del género *Sebastiania* es de gran importancia debido a su uso tradicional como antiséptico de uso externo, analgésico (García, 2007), por lo que se convierte en una excelente especie para su estudio fitoquímico.

El aislamiento y caracterización de compuestos químicos es de gran importancia ya que conociendo su estructura podemos entender su interacción con otras moléculas en el cuerpo humano y si en realidad la planta tiene las propiedades que popularmente se le adjudican, además de permitir descubrir sustancias activas a partir de una especie no estudiada previamente.



Figura 2.2. *Sebastiania longicuspis*. Por: Martínez E.(2010) *Sebastiania longicuspis*, Herbario Nacional MEXU, México.

2.2.3.1. Descripción de la especie *Sebastiania longicuspis*

A continuación se describe la especie *Sebastiania longicuspis*, haciendo referencia a su clasificación taxonómica, sinónimos, descripción botánica, hábitat y distribución geográfica

➤ Clasificación taxonómica de *Sebastiania longicuspis*

Reino: Plantae

Subreino: Magnoliophyta

División: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Sebastiania*

Especie: *longicuspis*

➤ Sinónimos de *Sebastiania longicuspis*:

- ✓ *Sebastiania standleyana*
- ✓ *Sebastiania confusa*
- ✓ *Pleradenophora longicuspis*
- ✓ *Pleradenophora tuerckheimiana* (De Melo, Esser, & De Sales, 2013)

➤ Descripción botánica

Árbol laticífero con dimensiones de 2 a 4 m de altura y tronco de hasta 25 cm de diámetro, ramas agudo espinosas de color gris, las secundarias perpendiculares a las primarias, las ramillas jóvenes presentan pulverulencia de color herrumbre. En la figura 2.3. se indican los vouchers de referencia de dos herbarios de *Sebastiania longicuspis*.

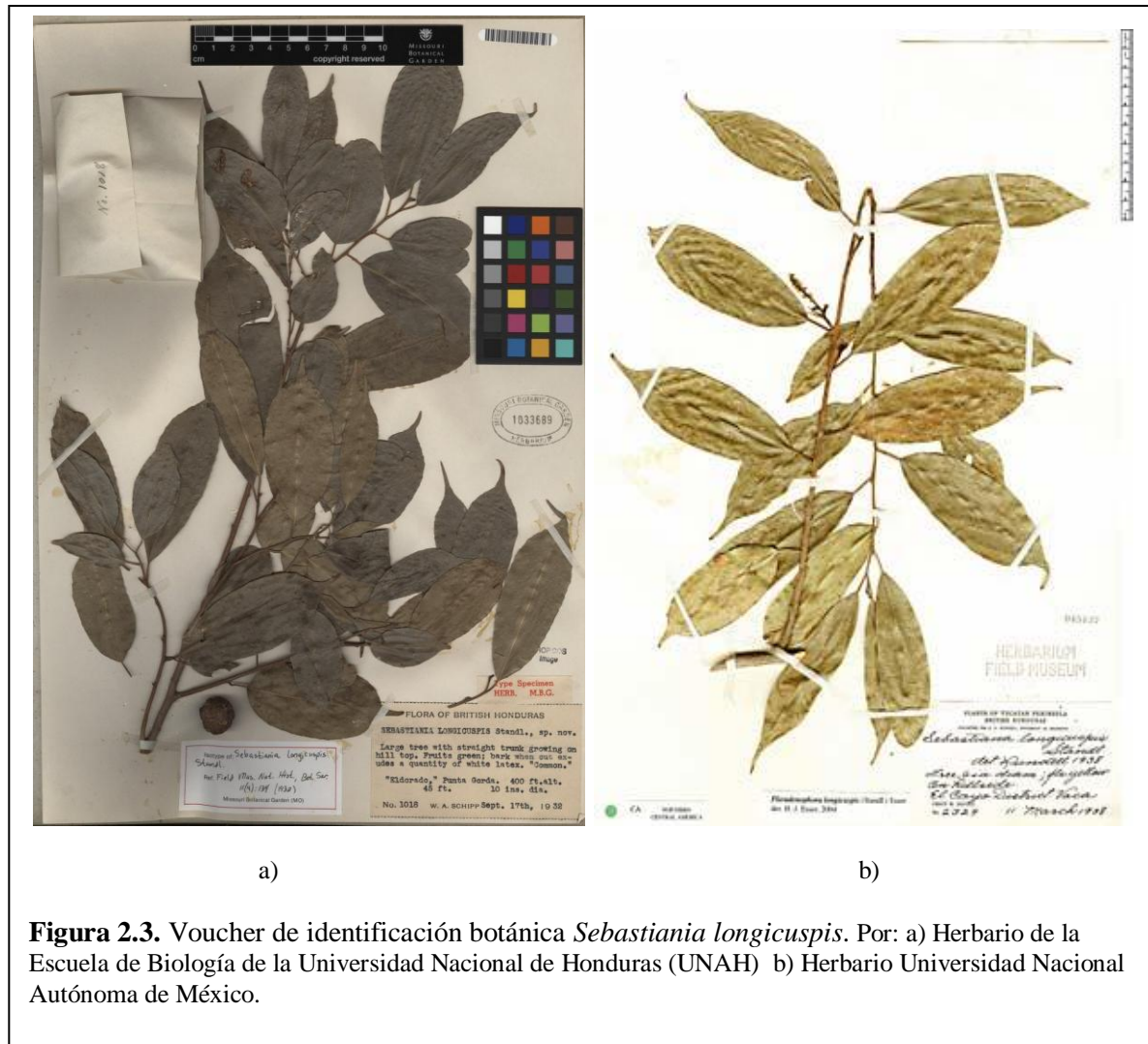
Hojas: Hojas subcoriáceas, elípticas a elíptico-lanceoladas, base cuneada y ápice obtuso o emarginado, alternas o en braquiblastos, 3-5 cm de longitud y 1,5-2,5 cm ancho, son estrigosas en el haz y presentan pelos glandulosos en el envés, el pecíolo mide 0,5-0,7 cm de longitud, las hojas nuevas con pulverulencia de color herrumbre y nervio principal de color ocre en el envés, con las nervaduras secundarias paralelas y oblicuas.

Flores: Flores hermafroditas, blanco-amarillentas, pediceladas, dispuestas en umbelas axilares, muy perfumadas, pedúnculo comprimido lateralmente, 0,2-0,4 cm long. Cáliz pubescente y estrigoso, 5 sépalos libres con bordes ondulados, ovales, persistentes, imbricados, 0,1-0,2 cm long., corola gamopétala, 5 lobulada 0,1-0,3 cm de longitud.

Estilo grueso de color marrón oscuro y 0,1 cm ancho.

Estambres 5, 0,1 cm long. Anteras ditecas, oblongas con filamentos cortos. Fruto baya negra globosa o subglobosa de 0,5-0,7 cm de diámetro, con apículo de 0,3-0,5 cm de longitud. (Delfino, 2005)

Frutos: Los frutos son drupas (De Melo, Esser, y De Sales, 2013)



➤ Hábitat

Sebastiania longicuspis es característica de los bosque húmedos subtropicales. (McCarthy, 2008)

➤ Distribución Geográfica

Sebastiania longicuspis se distribuye en el Sur-Este de México, Guatemala, Belice y Honduras, como se observa en la figura 2.4.



2.2.4. Metabolitos de las plantas

Las plantas producen y almacenan una gran cantidad de compuestos o metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos secundarios son los más familiares para los investigadores de productos naturales, puesto que son la fuente de los compuestos biológicamente activos. A continuación se hace referencia a estas dos clases de metabolitos en las plantas.

➤ Metabolitos Primarios

El metabolismo primario compromete aquellos procesos químicos que cada planta debe llevar a cabo cada día para sobrevivir y reproducir su actuación, como son: fotosíntesis, glicolisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, transaminación, síntesis de proteínas, enzimas y coenzimas, síntesis de materiales estructurales, duplicación del material genético, reproducción de células (crecimiento), absorción de nutrientes, etc.

Los metabolitos primarios se caracterizan por:

- Tener una función metabólica directa.
- Ser compuestos esenciales intermedios en las vías catabólica y anabólica.
- Encontrarse en todas las plantas.
- Tratar de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos o clorofilas.

➤ **Metabolitos Secundarios**

El metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales.

Dicho metabolismo es la química que conduce a la formación de un producto natural, algunas porciones de esta química son comunes para un número de plantas diferentes o familias de plantas, pero actualmente la química de productos naturales es usualmente diferente de una planta a otra, precursores químicos comunes pueden conducir a resultados diferentes.

Los metabolitos secundarios (en la mayoría de los casos) son compuestos químicos sintetizados por las plantas que no parecen ser necesarios para la supervivencia de las plantas, es decir que no intervienen en los procesos de alimentación, crecimiento y reproducción, que son incluidas en el metabolismo primario de las plantas, pero pueden suponer una ventaja competitiva considerable.

Los metabolitos secundarios poseen otras características, como son:

- No tener funciones metabólicas directas aparentes.
- Ser importantes para la supervivencia e interacción con el entorno.
- Presentar diferente distribución en el reino vegetal.

Estudios recientes ha determinado que la mayoría de metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra depredadores (como aves e insectos) y contra microorganismos patógenos (Swain, 1973), actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores y a los dispersadores de las semillas; además protegen a las semillas de la infección por patógenos microbianos.

De acuerdo con los biólogos evolucionistas, las defensas vegetales deben haber surgido a través de los fenómenos de mutación hereditaria, selección natural y cambios evolutivos. Mutaciones al azar en las

rutas metabólicas básicas darían lugar a la aparición de nuevos compuestos, que pudieron ser tóxicos o disuasorios para los herbívoros y microbios patógenos.

Como estos compuestos no eran tóxicos para la propia planta y el coste metabólico para producirlos no era excesivo, representaron una ventaja reproductiva para las plantas que los poseían frente aquellas que no poseían estas defensas; así, las plantas con defensas generaron una descendencia mayor que las plantas sin estas defensas, y transmitieron estos caracteres a las generaciones siguientes. (Taiz & Zeiger, 2006)

A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad; el estudio estructural de los metabolitos secundarios fue iniciado por químicos del siglo XIX y principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias su importancia como agentes medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria.

El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, nuevos antibióticos, insecticidas y herbicidas; además, la creciente apreciación de los diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas. (Bahamonde, 2008)

Los metabolitos secundarios vegetales pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno. La figura 2.5. muestra un esquema simplificado de las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interconexiones con el metabolismo primario.

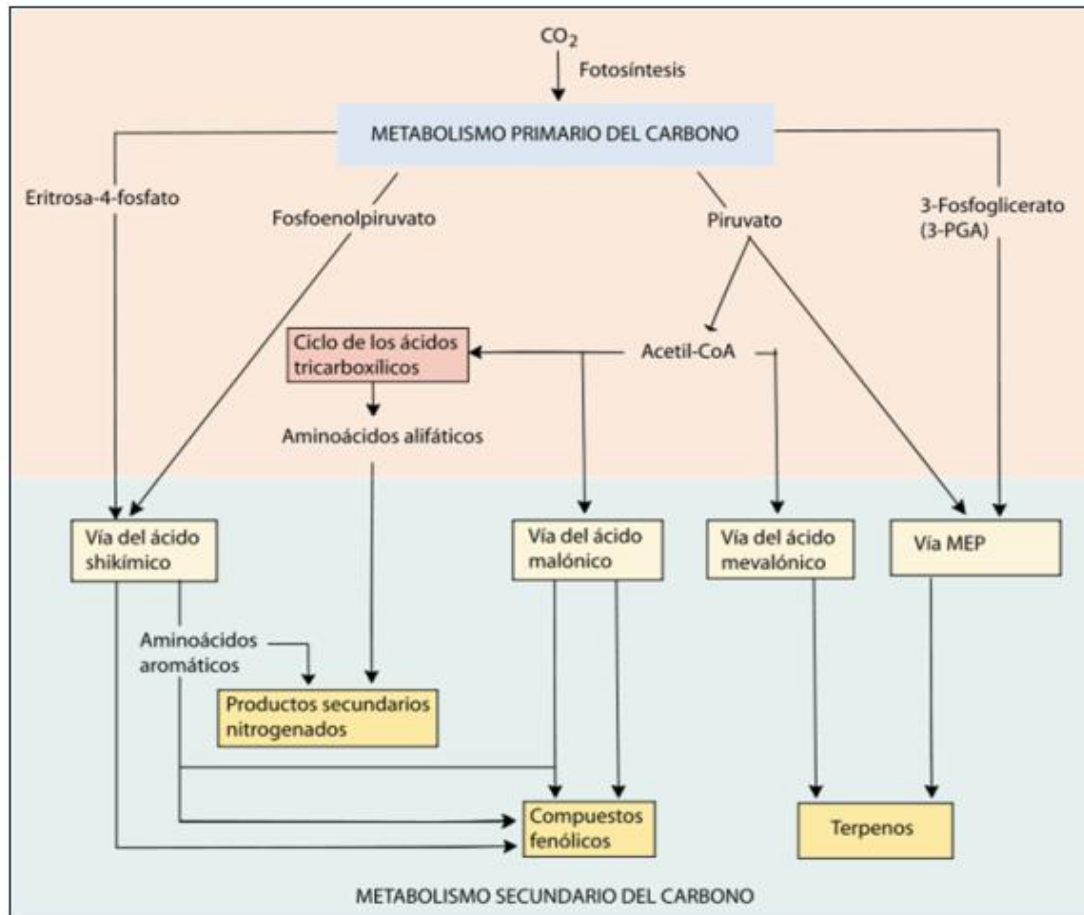


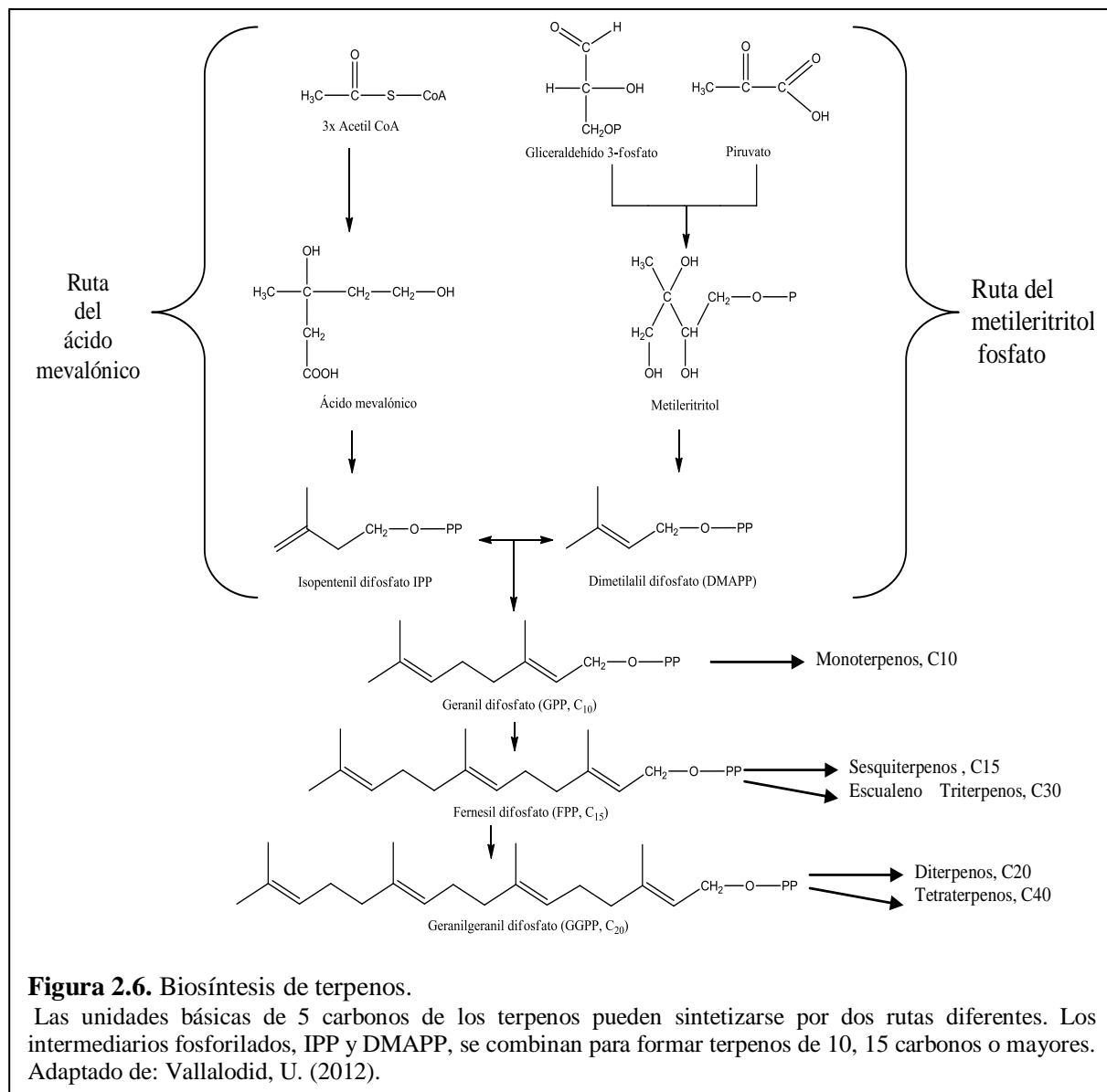
Figura 2.5. Metabolismo secundario del carbono. Por: Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (Vol. 1). Castelló de la Plana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I, p. 335.

2.2.4.1. Terpenos

Los terpenos o terpenoides, constituyen el mayor grupo de productos secundarios, los diferentes compuestos de esta clase son generalmente insolubles en agua, son biosintetizados a partir del acetil CoA o de intermediarios glicolíticos.

Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, se forman por la fusión de unidades de IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico.

En la figura 2.6. se esquematiza el biosíntesis de terpenos a partir de la ruta del ácido mevalónico y del metileritritol fosfato.



Así en ocasiones a los terpenos se los conoce como isoprenoides. ►

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen, aunque debido a las numerosas modificaciones metabólicas se puede hacer difícil reconocer las unidades originales de cinco carbonos. Los terpenos de diez carbonos, que contienen dos unidades de C₅, se denominan monoterpenos, los terpenos de 15 carbonos (3 unidades de C₅), son sesquiterpenos; y los terpenos que tienen 20 carbonos (4 unidades de C₅) son diterpenos. Los terpenos más grandes incluyen triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) y politerpenoides (C₅)_n, cuando n=8.

2.2.4.1.1. Síntesis de Terpenos

La figura 2.6. nos indica la síntesis general de terpenos. El isoprenil-pirofosfato es el punto de partida de la síntesis de los terpenos, carotenoides y esteroides.

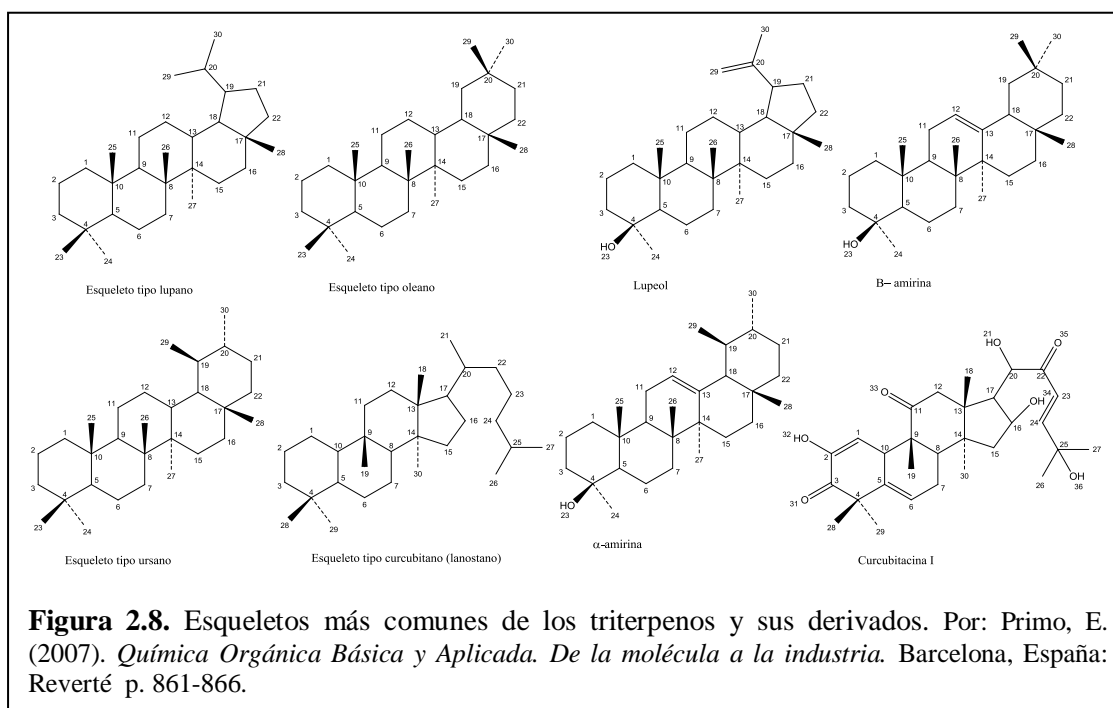
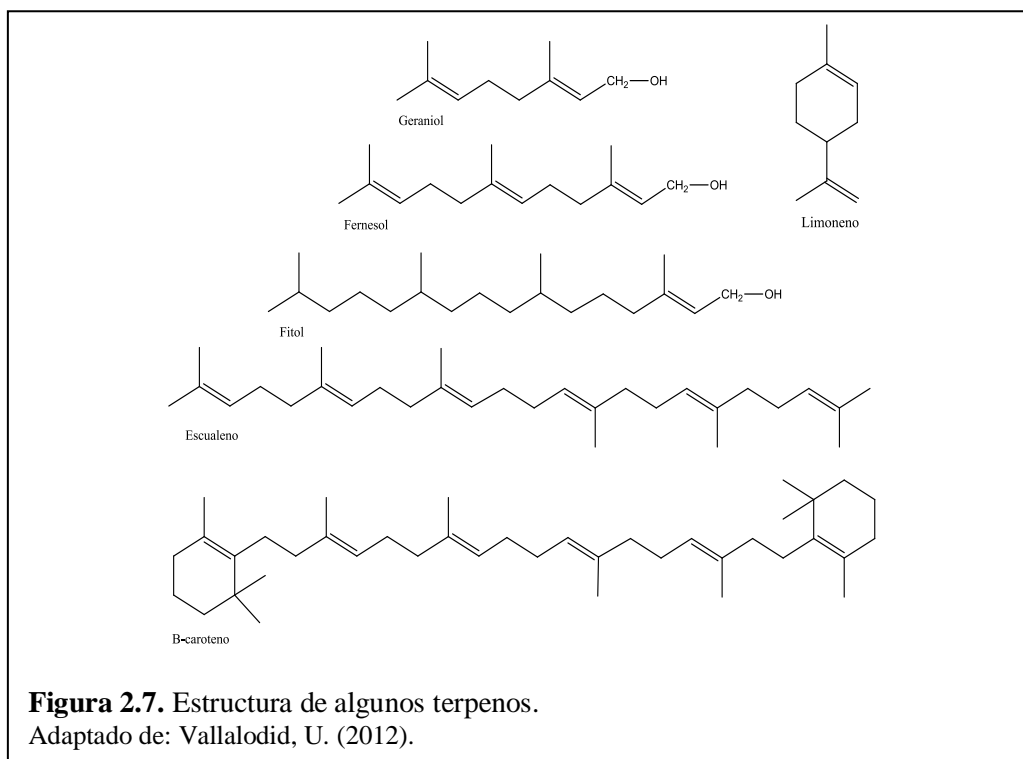
El primer paso consiste en la conjugación cabeza-cola de dos moléculas de isoprenil-pirofosfato para dar trans-geranil-pirofosfato que posteriormente se transforma en trans-farnesil-pirofosfato. (Vallalodid, 2012)

En la figura 2.7. podemos ver la formación de las estructuras básicas de los triterpenos, los cuales se forman a partir la unión cola-cola de dos moléculas de Farnesildifosfato (FPP). Entre los esteroides y esterol derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 Carbonos de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Entre los más abundantes entre las plantas con el estigmasterol y sitosterol. Además el escualeno es precursor de la síntesis de colesterol y algunos esteroides.

En la naturaleza la ciclación de los triterpenos se producen en formas muy diversas y se han encontrado muchos compuestos de este tipo con esqueletos diferentes. En la figura 2.8. se dan ejemplos de los más abundantes; además puede observarse una pequeña muestra de la extraordinaria variedad de estructuras y modificaciones que se dan en la naturaleza, del gran número de triterpenos que se han aislado.

El estudio de los procesos bioquímicos que suceden en las plantas para la biosíntesis de todos estos compuestos es una línea muy activa de investigación científica actual.

Los triterpenos policíclicos están muy extendidos, sobre todo en el reino vegetal, donde se encuentran generalmente en forma de ésteres o de glucósidos. (Primo, 2007)



2.2.4.1.2. Actividades biológicas de los triterpenos:

Dentro de las principales actividades biológicas que presentan los triterpenos se puede mencionar la anticancerígena y antitumoral, acción sobre el metabolismo, y antiinflamatoria. Además, ciertos triterpenos tienen actividad en la prevención de daños del hígado, como antivirales, antiparasitaria, hipoglucémica, entre otras muchas.

Los triterpenos pentacíclicos del tipo lupano, ejemplificados por lupeol [lup-20 (29)-en-3b-ol], se encuentra principalmente en las plantas de frutas comunes como el de oliva, mango, fresas, uvas, etc., se informó que poseen efectos beneficiosos como un agente terapéutico y preventivo para una serie de trastornos. Aunque lupeol exhibe una gran variedad de actividades biológicas como las actividades anti-inflamatorias y anti-artríticas, tanto *in vitro* e *in vivo*, se realiza una amplia exploración para establecer su papel como un compuesto quimiopreventivo. En los últimos 15 años se ha producido enormes esfuerzos realizados por investigadores de todo el mundo para desarrollar esta molécula maravillosa para su uso clínico hacia el tratamiento de una variedad de trastornos. Estos estudios también proporcionan información sobre el mecanismo de acción de lupeol y sugieren que es un agente de multi-destino con inmenso potencial anti-inflamatorio clave de orientación vías moleculares que implican el factor nuclear kappa B (NF- κ B), cFLIP, Fas, Kras, fosfatidilinositol-3-quinasa en una variedad de células. Es de destacar que el lupeol en sus dosis terapéuticas eficaces no muestra toxicidad para las células y tejidos normales. La percepción de la quimioprevención se encuentra todavía en su infancia. La intervención para reducir la velocidad, detener o revertir el proceso de la carcinogénesis por el uso de cualquiera de las sustancias naturales o sintéticas individualmente o en terapia de combinación ha surgido como un enfoque prometedor médico y pragmáticas para reducir el riesgo de cáncer. (Wal, Sharma, & Rai, 2011, p. 97-98)

2.2.4.2. Esteroles

Los fitosteroles son esteroides vegetales estructuralmente similares al colesterol. Estos incluyen principalmente campesterol, sitosterol, estigmasterol, y sus respectivos estanoles (derivados 5 α -saturados), que químicamente se asemejan al colesterol. Un fitoquímico en la dieta basado en plantas es de importancia en la reducción de riesgos de la hormona relacionada con neoplasias.

Hay una serie de fitoesteroides, incluyendo beta-sitosterol, estigmasterol, campesterol, y brasicasterol. (Wal et al. 2011, p.100). La figura 2.9. indica la ruta metabólica para la síntesis de los fitoesteroides más abundantes.

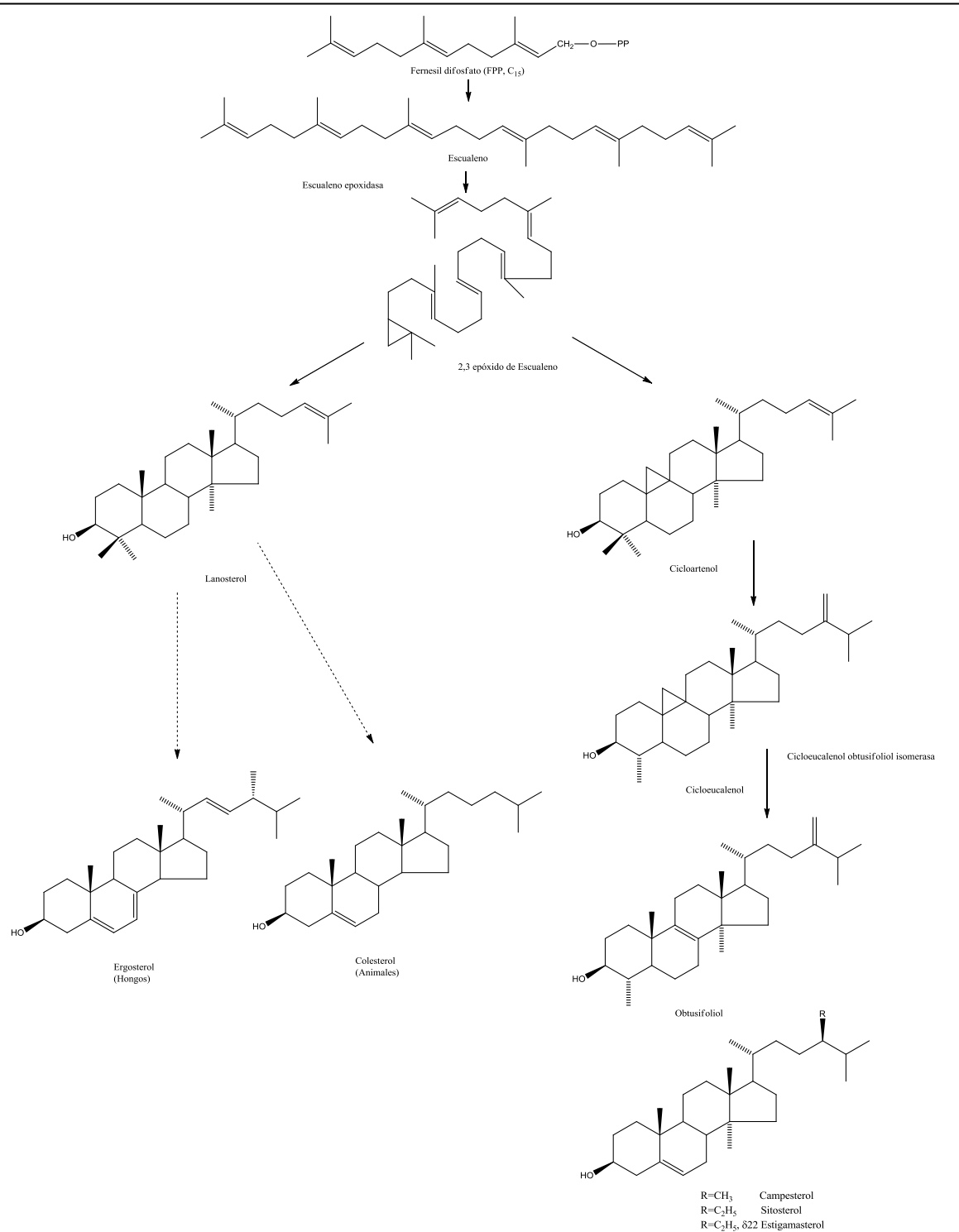


Figura 2..9. Ruta biosintética de los esteroides

Por: Wal, P., Wal, A., Sharma, G., & Rai, K. (2011). Biological activities of lupeol. *En: Syst. Rev. Pharm.*, 2, 96-103.

2.2.4.2.1. Actividades biológicas de los esteroides

Estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que la dieta de esteroides vegetales puede ofrecer protección frente a los tipos de cáncer más comunes en las sociedades occidentales, como el de colon, de mama y de próstata. Las razones pueden incluir el efecto de los fitosteroides en la estructura y función de membrana de tumor y tejido del huésped, las vías de transducción de señales que regulan el crecimiento tumoral y la apoptosis, la función inmunológica del huésped y el metabolismo del colesterol por el anfitrión.

Los fitosteroides y colesterol

Sahelian (2012) indica que los fitosteroides y los fitosteroides de colesterol inhiben la absorción intestinal de colesterol, y los ésteres de estanol de plantas son grasas solubles que se introdujeron como alimento funcional para reducir el colesterol sérico en la década de 1990; los ésteres de esteroides vegetales entraron en el mercado a finales de la década de 1990. La inhibición de la absorción intestinal de colesterol estimula la síntesis de colesterol, un factor que limita la reducción de colesterol en suero a aproximadamente 10% con fitosteroides; una dieta con esteroides y ésteres de estanol de plantas reduce la absorción y las concentraciones séricas de colesterol, mientras una dieta rica en ésteres de estanol de plantas, especialmente en combinación con estatinas, reduce el colesterol en suero, pero aumenta los niveles séricos de estanol de origen vegetal.

A largo plazo la reducción del colesterol, necesario para la prevención de enfermedad es cardíacas coronaria, pueden tener éxito con ésteres de estanol de plantas, que reducen el colesterol sérico en ambos sexos durante al menos un año.

Estigmasterol, sitosterol y el colesterol

Los esteroides vegetales compiten con el colesterol para la absorción intestinal para limitar la absorción y reducir las concentraciones plasmáticas de colesterol. El stigmasterol (24-etil-colesta-5,22-dien-3beta-ol; Delta (22) derivado de sitosterol [24-etil-colest-5-en-3beta-ol]), pero no campesterol (24-metil-colest-5-en-3beta-ol) y sitosterol, se informa que inhiben la biosíntesis de colesterol a través de la inhibición de la esteroide Delta (24)-reductasa humana en células Caco-2 y en líneas celulares HL-60. Los investigadores estudiaron el efecto de la alimentación 0,5% stigmasterol en esteroides en plasma y en el hígado y el colesterol intestinal y la absorción de sitosterol en 12 ratas salvajes Kyoto (WKY: wild-type Kyoto) y 12 ratas Wistar; después de 3 semanas de alimentación, el colesterol y la absorción de sitosterol se determinó en 6 ratas de cada grupo mediante el método de relación en plasma con doble isótopo; después de 3 semanas más, las concentraciones de esteroides plasmáticas y hepáticas

y las actividades de las enzimas hepáticas se determinaron en todas las ratas. Posterior a una alimentación a base de estigmasterol, el colesterol plasmático basal fue de 1,3 veces y esteroides de plantas 3 veces mayor en ratas WKY que en ratas Wistar. La alimentación con estigmasterol redujo el colesterol en plasma en aproximadamente un 11%, mientras que los niveles de campesterol y sitosterol en el plasma eran prácticamente iguales en ambas cepas de ratas, y el estigmasterol constituía 3,2% de esteroides en plasma en ratas WKY y el 1% en ratas Wistar. Después de 6 semanas de alimentación, el colesterol y la absorción de sitosterol disminuyó de 23% y 30%, respectivamente, en ratas WKY, y 22% y 16%, respectivamente, en las ratas Wistar en comparación con las ratas no tratadas. En conclusión, estigmasterol, en la alimentación, disminuye los niveles de colesterol en plasma, inhibe la absorción intestinal de colesterol y de esteroides de plantas, y suprime el colesterol hepático y la síntesis clásica de ácido biliar en ratas Wistar, así como las ratas WKY. Sin embargo, la incorporación de estigmasterol en plasma e hígado es baja. (Sahelian, 2012)

2.2.4.3. Compuestos fenólicos:

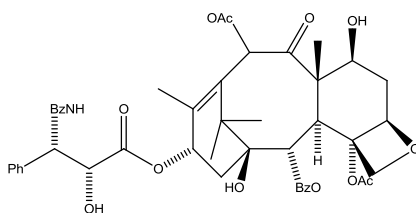
Compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y sus derivados. Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato. Incluyen a los fenilpropanoides, lignanos, cumarinas, taninos gálicos, antraquinonas, flavonoides y taninos condensados. La figura 2.9. indica los productos finales del metabolismo secundario

2.2.5. Criterios de selección en la búsqueda de Compuestos Bioactivos de plantas

Para la investigación química de plantas existen muchos caminos, pero existen algunas estrategias reconocidas para la selección de plantas para el hallazgo de constituyentes bioactivos: al azar, taxonómico, (fito) químico (también llamado quimiotaxonómico), etnomédico y búsqueda bibliográfica. Serendipia y ecológico son otras vías para el hallazgo de agentes terapéuticos útiles. (Espinosa & Delgado, 1998)

Al azar.- las plantas son colectadas sin consideraciones previas de conocimiento u observación natural y la única condición es la disponibilidad de la especie, esta estrategia exploratoria es muy usada en plantas poco conocidas o sin estudios previos. En este aspecto el estudio fitoquímico básico es importante para proporcionar información para futuros estudios y para la comparación con grupos relacionados de plantas.

Resulta interesante el taxol (**46**), uno de los mejores agentes anticancerígenos descubiertos en muchos años, el cual fue aislado de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) en un programa de screening para la búsqueda de agentes antitumorales donde las plantas fueron colectadas al azar. *T. brevifolia* nunca fue estudiada hasta antes de 1964, sin embargo plantas pertenecientes a este género tienen muchos usos medicinales, principalmente en Europa. La estructura final del taxol fue publicada en 1971. Taxol acelera la polimerización de la tubulina y estabiliza las estructuras celulares llamadas microtúbulos. Como resultado de este descubrimiento y el desarrollo de este producto natural y compuestos estructuralmente relacionados como agentes terapéuticos, muchos laboratorios en el mundo están investigando estructuras alternativas del taxol.



46

Taxonómico.- Solo las plantas pertenecientes a una taxa específica y definida son consideradas para los estudios. Este enfoque es muy útil en la identificación de la diversidad química, cambios ontológicos, y la variabilidad química de los constituyentes y la actividad biológica en un determinado taxón.

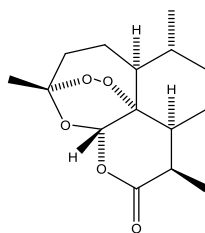
(Fito) químico.- También conocido como quimiotaxonómico, un tipo particular de compuestos son los más interesantes para el estudio, se considera que las plantas probablemente pueden biosintetizar compuestos estructuralmente relacionados se evalúan y se analizan. Para el screening y para la detección de tipos particulares de compuestos en diferentes familias se utilizan métodos químicos y biológicos, por ejemplo la búsqueda de acetogeninas anonáceas bioactivas se han identificado en varios géneros: *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollina*, *Uvarina*, *Xylopia*. *Iridoides*, constituyen un grupo importante de hemiterpenos generalizados en varias familias incluidas la *Loganiaceae*, *Rubiaceae*, *Boraginaceae*, *Gentianaceae*, entre otros. Algunos de estos compuestos muestran actividad antioxidante.

Este criterio de selección consiste en la sistematización de las relaciones filogenéticas de los diferentes taxa y las rutas biosintéticas mediante las que se forman los metabolitos secundarios.

La presencia de diferentes compuestos como marcadores biosintéticos es empleada por los botánicos en sus estudios de taxonomía; pero también sirve como herramienta en la selección exitosa de familias, subfamilias y géneros para ser investigados en función de los metabolitos que se prevé producen. Es por ello que se pueden seleccionar especies bien relacionadas filogenéticamente de plantas con actividad conocida o plantas que contienen el mismo tipo de entidad química conocidas por su actividad. (Abreu & Cuéllar, 2008)

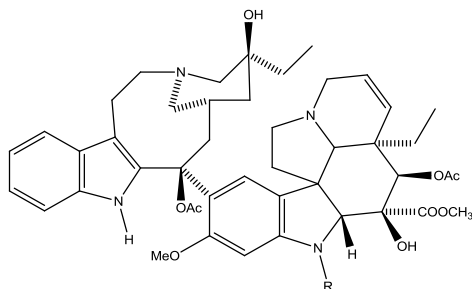
Etnomédico.- El screening de los constituyentes bioactivos está guiado por el conocimiento de la medicina tradicional. Históricamente este enfoque para el descubrimientos de drogas ha sido exitoso y se pueden citar varios ejemplos: la planta medicinal china qinghao (*Artemisa annua*, Compuesta) ha sido utilizada en Asia para la terapia de la malaria por más de dos siglos, su principal metabolito se nombró: qinghaosu, artemisina (**47**) se aisló y caracterizó en 1972.

El screening de artemisa en otras especies de *Artemisia* alrededor del mundo muestran que *A. annua* es la única especie que contiene una apreciable cantidad (0.01-0.5%) de este compuesto. (Espinosa & Delgado, 1998)



47

Serendipia.- La colecta y análisis de plantas basadas en el criterio de usos tradicionales o con propósitos taxonómicos permiten el descubrimiento de otra actividad biológica significativa. Los alcaloides de *Catharanthus roseus* se pueden considerar como un importante ejemplo. La planta fue utilizada en medicina tradicional por varias culturas para el tratamiento de la diabetes, principalmente en Madagascar; sin embargo, las propiedades antileucémicas de los alcaloides vincristina (**48**) y vinblastina (**49**), que son dos de los agentes más usados en quimioterapia para algunos cánceres fueron descubiertos incidentalmente. (Espinosa & Delgado, 1998)



48 R= CHO

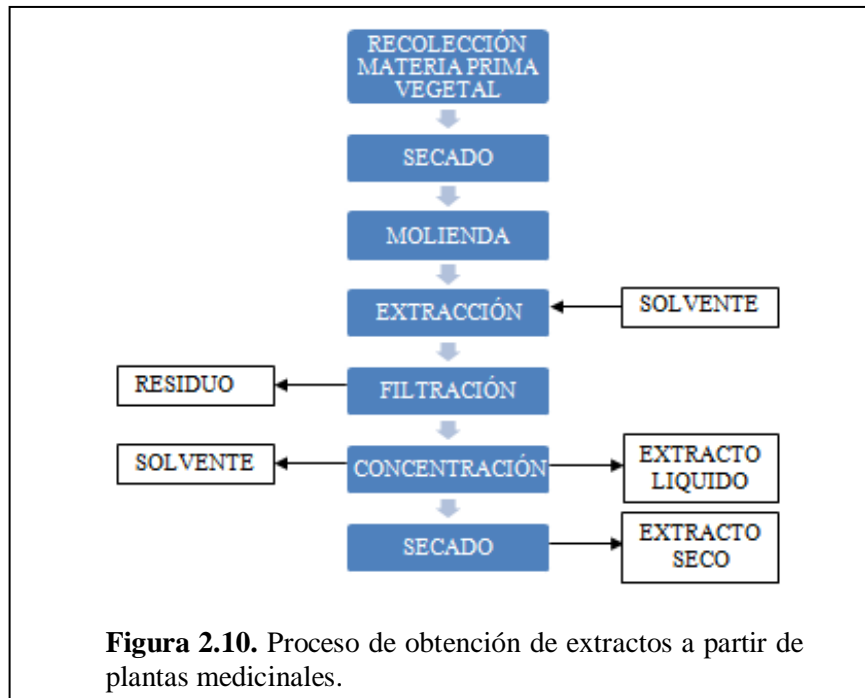
49 R= CH₃

Ecológico.- A partir de observaciones de interacciones entre organismos en su medio ecológico se inducen posibles actividades biológicas (antibacterianas, antifúngicas, plaguicidas, tóxicas), también se propone una variante que resulta muy sugerente, lo cual se ha denominado Zoofarmacognosia, y se basa en el estudio de plantas empleadas por animales cuando se encuentran enfermos, usualmente primates.

Varios estudios de actividad biológica y fitoquímicos han demostrado efectos antibacterianos y antiparasitarios de plantas que primates suelen consumir tomando solo la savia de las hojas y ramas o tragando las hojas enteras. (Abreu & Cuéllar, 2008)

2.2.6. Métodos de Obtención de extractos a partir de plantas

En la figura 2.10. se explica el proceso general de obtención de extractos a partir de plantas medicinales



Uno de los aspectos más importantes en la producción de extractos medicinales es garantizar altos rendimientos del material vegetal y elevado contenido de principios activos, lo que depende entre otros aspectos de:

- Elección adecuada del material vegetal (según criterios de selección).
- Factores precosecha: disponibilidad de la especie, factibilidad del cultivo, lugar y época de cultivo e identificación botánica.
- Factores postcosecha: selección, secado, molinado y almacenaje.

Las condiciones de cosecha y procesamiento influyen en la cantidad final de metabolitos recuperables del tejido de las plantas. Se debe conocer la parte de la planta a cosechar, la época y la forma de corte. (Chife, 2005).

A continuación se muestra una lista con ejemplos sobre la época óptima de cosecha la que varía con el órgano vegetal (Chife, 2005):

Parte de la planta	Época de cosecha
Hojas	Fase más activa de la fotosíntesis
Frutos	Cuando están totalmente desarrollados
Flores	Estado de botón floral
Raíces	Cuando están bien desarrolladas
Cortezas	En primavera, evitando períodos de lluvias intensas

Del manejo postcosecha dependerá en gran medida que el material mantenga y conserve las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas.

El material fresco debe ser inmediatamente bien manipulado de forma que no se deteriore, desechando partes manchadas o enfermas de la planta, así como realizar el lavado con agua corriente de ser necesario.

Por regla general se recomienda secar el material vegetal antes de realizar la molienda, lo que evita el riesgo de contaminación por hongos. (Rivero, et al., 2005)

Las condiciones de secado deben ser estudiadas debidamente pues la humedad excesiva, la incidencia de sol directo y el polvo atmosférico deterioran el material destruyendo sus propiedades medicinales, con la consecuente disminución de la calidad de la materia prima.

Entre los métodos de secado más utilizados encontramos: secado en estufa, secado al sol y secado a la sombra, siempre teniendo en cuenta que el secado del material vegetal se debe realizar a condiciones moderadas de temperatura.

Para la reducción del tamaño del material vegetal existe una amplia variedad de equipos, se destacan los molinos de diferentes tipos como: molinos de cuchilla (corta y desgarras), molinos de martillo (rompe y fragmenta) y molinos de rodillos (machaca y tritura).

Durante el almacenamiento de la materia prima vegetal, debe ser evaluada su estabilidad ya que los procesos de envejecimiento que ocurren durante estas etapas pueden degradarla considerablemente.

2.2.6.1. Métodos de extracción

La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados (USP 30, 2007).

-Maceración

El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto.

-Percolación o lixiviación

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto.

Obtención de extractos

Es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal, por ejemplo:

- ✓ Naturaleza química de la materia prima vegetal: conocer las características del metabolito o compuesto químico a extraer.
- ✓ Selección del solvente: definir la selectividad del solvente a emplear, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés.
- ✓ Relación sólido-líquido: la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción.
- ✓ Tamaño de partícula del sólido: de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partícula muy pequeños conducen a la formación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción.

- ✓ Temperatura: el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el menstruo es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables.
- ✓ Velocidad de agitación y tiempo de extracción: los óptimos valores de estos parámetros serán aquellos que logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.
- ✓ Viscosidad del medio: no deben seleccionarse solventes de viscosidad relativamente alta.

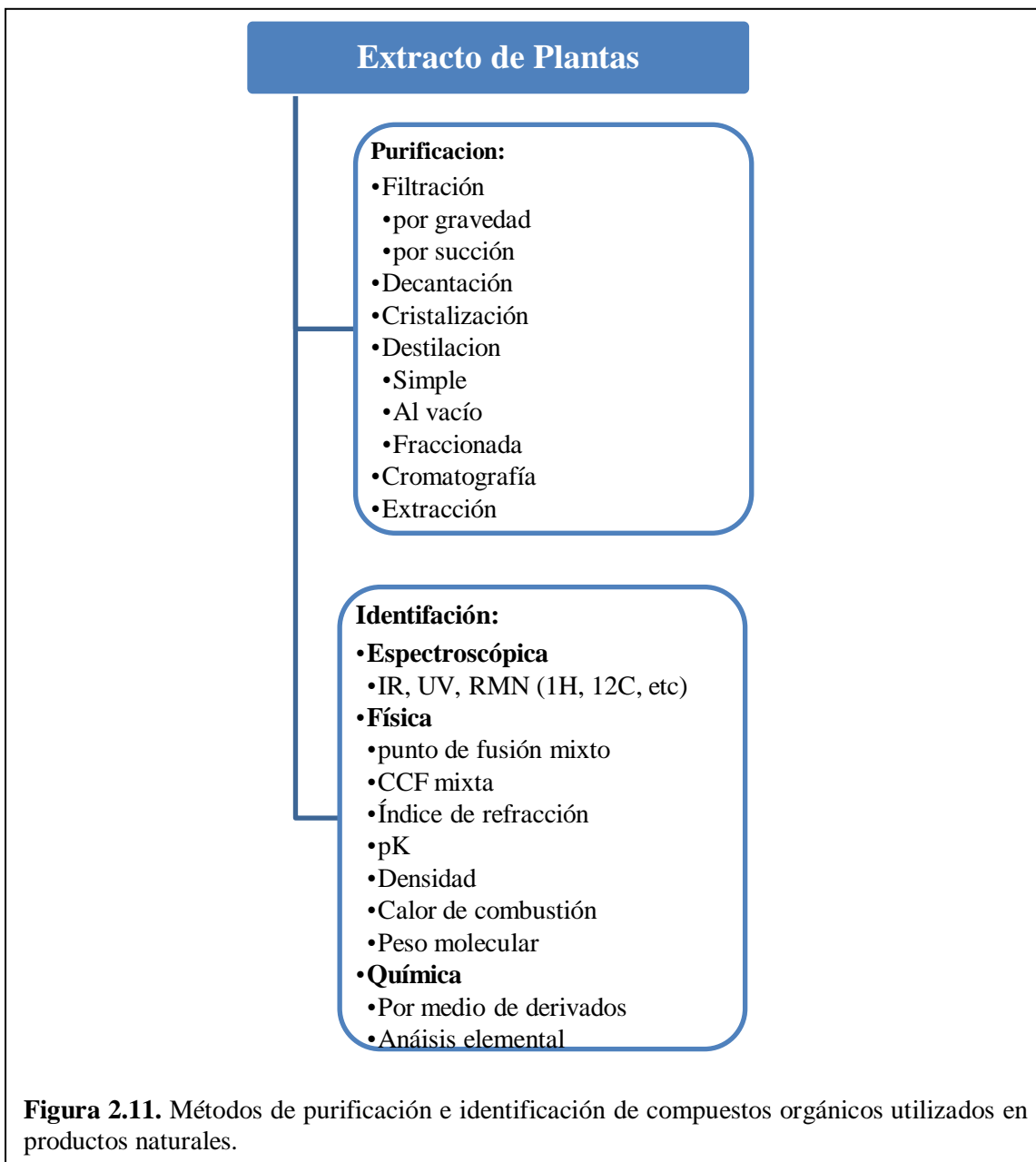
2.2.6.2. Concentración de extractos

Toda vez que se ha realizado la etapa de extracción, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto. Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el rotavapor es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores), también pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otras.

2.2.7. Métodos de purificación e identificación

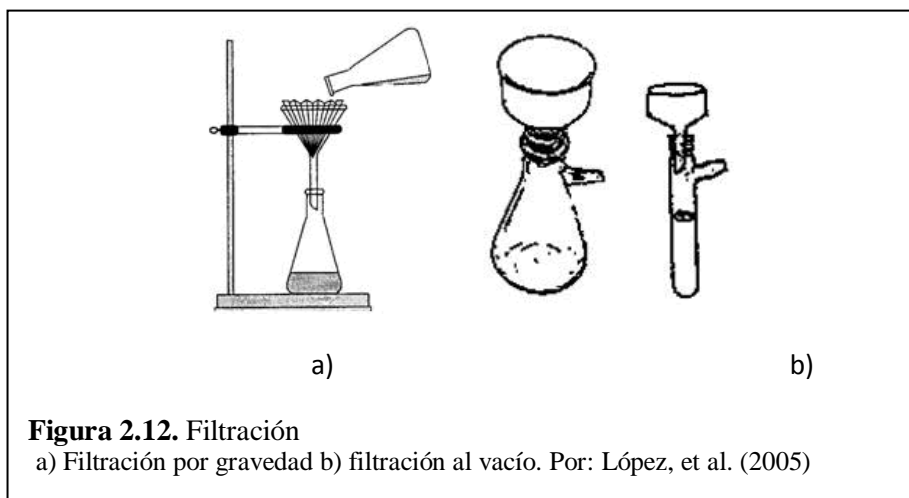
El trabajo de análisis y/o investigación en un laboratorio relacionado con Química Orgánica requiere de la aplicación de varias técnicas que permitan obtener de manera eficiente los resultados que se esperan desde el aislamiento, así como también la purificación e identificación.

Estos métodos están basados en las diferencias que existen entre las propiedades físicas de los componentes de una mezcla (puntos de ebullición, densidad, presión de vapor, solubilidad, etc.). En la figura 2.11. se resumen algunas de las técnicas de purificación y de identificación en productos naturales.



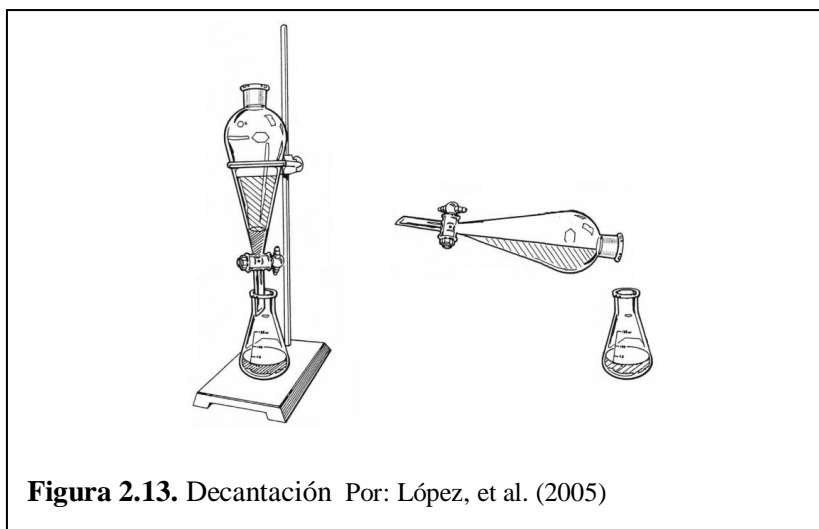
2.2.7.1. Filtración

El método más utilizado es el de filtración por gravedad, el cual consiste en retener partículas sólidas suspendidas de un líquido o un gas forzando la mezcla a través de una barrera porosa que puede ser mallas, fibras, material poroso o un relleno sólido; también es utilizado el método de filtración al vacío, mediante el embudo Buchner; en la figura 2.12. se indica el material utilizado para estos dos tipos de filtraciones.



2.2.7.2. Decantación

La figura 2.13. indica el proceso de decantación, el cual consiste en separar componentes que contienen diferentes fases siempre que exista una diferencia significativa entre las densidades de las fases (dos líquidos no miscibles, un sólido de un líquido, etc.). (López, et. Al, 2005)



2.2.7.3. Cristalización

Proceso de separación de un soluto a partir de su disolución, por sobresaturación de la misma, aumento de la concentración o por enfriamiento de esa disolución.

La cristalización permite separar solutos prácticamente puros.

¿Cómo se sobresatura una disolución para que comience a cristalizar el soluto?

- Saturando la disolución en caliente con posterior enfriamiento de la misma
- Aumentando su concentración evaporando una parte del disolvente
- Adicionando a la disolución otra sustancia más soluble en el disolvente que el compuesto que se desea separar.

El proceso de cristalización

Técnica más simple y eficaz para purificar compuestos orgánicos sólidos.

Consiste en disolver el sólido impuro en la menor cantidad de disolvente posible y en caliente. En estas condiciones se genera una disolución saturada que a medida que se va enfriando se sobresatura y origina la cristalización.

Como el proceso de cristalización es dinámico, las moléculas que están en la disolución alcanzan el equilibrio con las que forman parte de la red cristalina. El alto grado de ordenación de esa red no permite la participación de impurezas en la misma. Por eso es conveniente que el proceso de enfriamiento sea lento para que los cristales se formen poco a poco y el lento crecimiento de la red cristalina excluya las impurezas.

Si el enfriamiento de la disolución es muy rápido las impurezas pueden quedar atrapadas en la red cristalina. (López, et al., 2005)

Elección del disolvente de cristalización

Para su elección es muy útil la regla “semejante disuelve semejante”. Los disolventes más usados en orden de polaridad creciente son: hexano, cloroformo, acetona, acetato de etilo, etanol y agua.

Es conveniente elegir un disolvente cuyo punto de ebullición no sea superior a 60°C y que a su vez sea por lo menos 10 °C menor que el punto de fusión del sólido que se desea cristalizar, para que se pueda eliminar fácilmente por evaporación.

Muchas veces es necesario usar una mezcla de disolventes y es conveniente probar diferentes mezclas hasta encontrar aquella que nos proporcione la cristalización más efectiva. Una vez obtenidos los

cristales se procede a eliminar el líquido sobrenadante llamado “aguas madres” generalmente mediante un proceso de decantación. (López, et al., 2005)

2.2.7.4. Recristalización

Con el fin de conseguir una cristalización más correcta algunas veces es necesario llevar a cabo una recristalización. La finalidad de este proceso es conseguir un adecuado grado de pureza que nos permita determinar el punto de fusión de la sustancia.

El punto de fusión de un compuesto es una característica física que nos confirma el grado de pureza de una muestra. No se puede hablar de punto de fusión exacto sino de un intervalo de fusión. Si la muestra está impura el intervalo de fusión es alto.

A continuación se indica una lista de los disolventes más empleados en la cristalización según los compuestos orgánicos más comunes. (López, et al.2005)

Tipos de compuestos	Disolventes sugeridos
Hidrocarburos	Hexano, ciclohexano, tolueno
Éteres	Éter, diclorometano
Haluros	Diclorometano, cloroformo
Compuestos carbonilos	Acetato de etilo, acetona
Alcoholes y ácidos	Etanol
Sales	Agua

2.2.7.5. Destilación

La separación y purificación de líquidos por destilación constituye una de las principales técnicas para purificar líquidos volátiles. La destilación hace uso de la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias que constituyen una mezcla.

Las dos fases en una destilación son la vaporización o transformación del líquido en vapor y la condensación o transformación del vapor en líquido. Existen varios tipos de destilaciones. La elección en cada caso se hace de acuerdo con las propiedades del líquido que se pretenda purificar y de las impurezas que lo contaminan.

El método físico consiste en suministrar calor a la mezcla logrando que el líquido de menor punto de ebullición se vaporice en primer lugar y luego se produzca la condensación de ese vapor al ponerlo en contacto con una superficie fría.

En la figura 2.14. se indican los equipos utilizados en proceso de destilación simple y destilación fraccionada.

A continuación se describen las características de los tres tipos de destilaciones empleadas en la investigación:

Destilación simple

- Técnica utilizada en la purificación de líquidos cuyo punto de ebullición es inferior a 150°C a la presión atmosférica.
- Útil para eliminar impurezas no volátiles
- También sirve para separar dos líquidos con puntos de ebullición que difieran en al menos 25 °C.
- El vapor formado por la ebullición del componente, simplemente se condensa y se recoge en el matraz.

Destilación a vacío o presión reducida

- Técnica usada en la separación de líquidos con un punto de ebullición superior a 150 °C.
- Como un líquido hierve cuando su presión de vapor iguala la presión atmosférica, se puede reducir su punto de ebullición disminuyendo la presión a la cual se destila.
- Para mantener una ebullición homogénea se puede usar plato poroso o adaptar al conjunto un capilar para mantener la ebullición homogénea.
- Este montaje nos permite destilar líquidos a bajas temperaturas evitando de esta forma la descomposición térmica de las sustancias.
- Similar al anterior excepto que el sistema se conecta a una bomba de vacío o una trompa de agua.

Destilación fraccionada

- Técnica que se utiliza en la separación de sustancias cuyos puntos de ebullición difieren entre sí menos de 25°C.⁹
- La diferencia con la destilación simple es que incorpora una columna de fraccionamiento (o de rectificación) entre la disolución y el refrigerante. (figura 2.14.)
- La columna de fraccionamiento consta de un tubo largo de vidrio que lleva en su interior un relleno inerte (hélices de vidrio) o unos platos de condensación.

- La columna aporta una gran superficie para el intercambio entre el vapor que sube y el condensado que desciende, lo que hace posible una serie de vaporizaciones y condensaciones a lo largo de la columna.

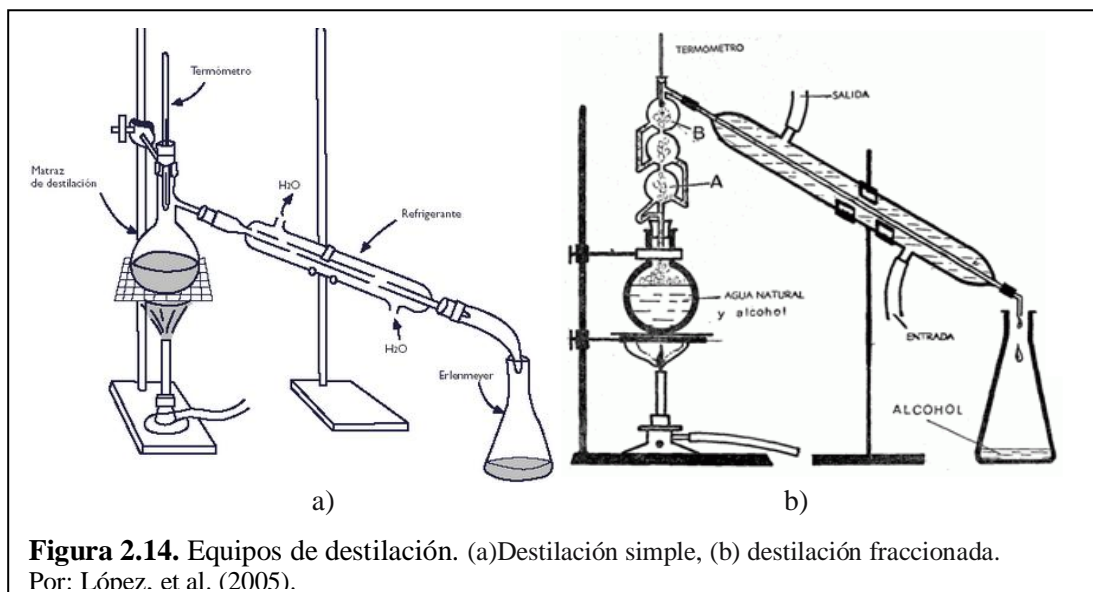


Figura 2.14. Equipos de destilación. (a) Destilación simple, (b) destilación fraccionada.
Por: Lóñez. et al. (2005).

El proceso de destilación fraccionada

En cualquier punto de esa columna de fraccionamiento, el condensado frío recibe calor del vapor que asciende y se vuelve a vaporizar parcialmente formando un vapor que se enriquece en el componente más volátil.

De la misma manera, al ceder calor al condensado el vapor se enfría formando un condensado más rico en el componente menos volátil.

Con la columna adecuada y un control suficiente de la temperatura se pueden separar con esta técnica líquidos que difieren unos pocos grados en su punto de ebullición.

Una destilación fraccionada es equivalente a una secuencia de destilaciones simples y por tanto un proceso más eficiente.

2.2.7.6. Extracción

Técnica general más utilizada para el aislamiento y purificación de un compuesto orgánico de una mezcla de reacción o de sus fuentes naturales

Se aplica a todo tipo de mezclas ya sean sólidas, líquidas o gaseosas

Está fundamentada en la diferencia de solubilidades de los compuestos.

Ley de distribución o reparto

La distribución de un soluto entre dos disolventes inmiscibles está gobernada por la ley de Distribución o de Reparto.

Para un soluto A distribuido libremente entre dos fases se cumple:

$$K = \frac{[Ao]}{[Aw]}$$

[Ao] = Concentración del soluto en la fase orgánica

[Aw] = Concentración del soluto en la fase acuosa

K = Coeficiente de reparto

El soluto A se distribuye entre las dos fases en función de su solubilidad en ambas originando un equilibrio de partición dinámico. Este equilibrio viene definido por su constante de equilibrio, constante de distribución o coeficiente de reparto K.

Cuando se ha alcanzado el equilibrio se establece una diferencia entre las relaciones de concentración en ambas fases.

Esa relación de concentraciones entre la fase orgánica y la fase acuosa es independiente de la cantidad total de A.

Mediante extracciones sucesivas con pequeñas porciones del disolvente extractante, se separa mayor cantidad de soluto que con una sola extracción en la que se utilice todo el volumen de extractante. (López, Triana, Pérez, & Torres, 2005)

Extracción líquido – líquido

Consiste en tratar la mezcla de compuestos con un disolvente de tal forma que uno de los componentes se disuelva en dicho disolvente y el resto de las sustancias no lo haga.

Los compuestos orgánicos en disoluciones acuosas se extraen generalmente agitando vigorosamente dicha solución con un disolvente orgánico no miscible.

El proceso se realiza en un embudo de decantación

El proceso de extracción líquido – líquido

1. Se agita vigorosamente ambas capas
2. Se deja sedimentar ambas capas.
3. Se separan

La eliminación del disolvente se realiza en un rotavapor

Eliminación de un disolvente a presión reducida (rotavapor)

Consiste en eliminar un disolvente orgánico de una mezcla de reacción mediante el rotavapor (figura 2.15.).

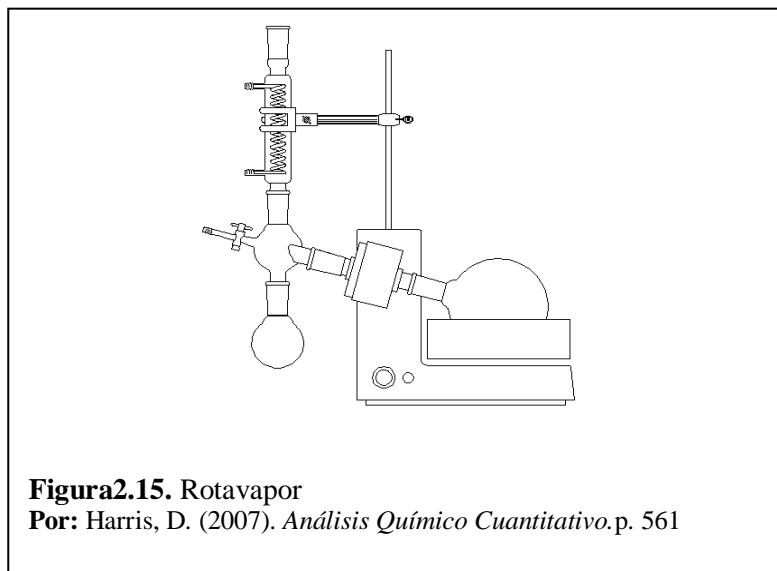
El motor eléctrico produce el giro de un tubo que tiene un ajuste esmerilado al cual se acopla el matraz de fondo redondo que contiene la disolución.

El matraz debe estar parcialmente sumergido en un baño de agua y girando.

En el caso de disolventes orgánicos usuales la temperatura del baño debe oscilar entre 35 – 60 °C

Acoplado al sistema hay un refrigerante por el que circula generalmente agua, que origina la condensación de los vapores del disolvente que se recogen en un colector.

El conjunto es un sistema cerrado conectado a una bomba de vacío, una trompa de agua o un circuito de vacío. Esto también se puede realizar mediante destilación simple, sin embargo, es el procedimiento más empleado por ser más rápido y cómodo.

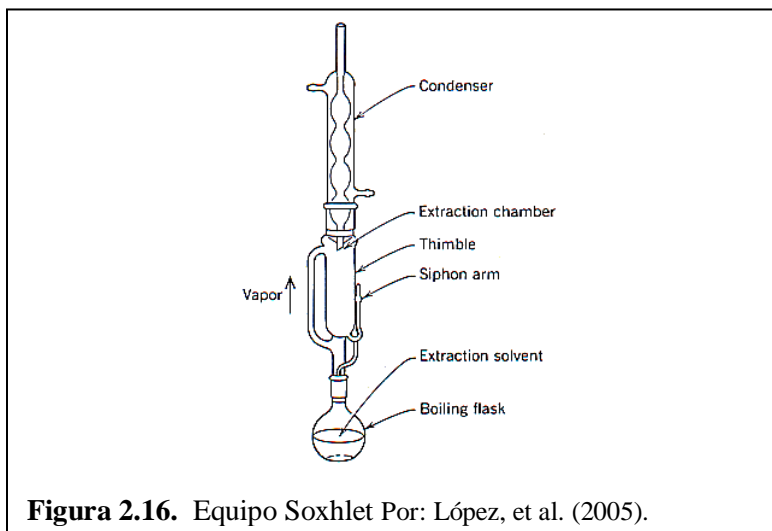


Extracción sólido – líquido

Para la extracción continua donde la sustancia a extraer se encuentra en estado sólido y el extractor es un líquido se emplea el SOXHLET (figura 2.16.).

Técnica más utilizada y consiste en extraer la mezcla con un disolvente que disuelve todos los componentes.

La extracción continua es una combinación de extracción – destilación que permite la recuperación del disolvente. (López, Triana, Pérez, & Torres, 2005)



2.2.7.7. Cromatografía

Es una técnica muy utilizada para separar, identificar y determinar los componentes químicos de mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía. (Skoog, 2001)

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una *fase móvil* que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una *fase estacionaria* que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de que los componentes hayan pasado por la fase estacionaria, separándose, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.

Diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos da como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y por tanto una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.

La cromatografía puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente:

- Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente (etapa final de muchas síntesis).
- Medir la proporción de los componentes de la mezcla (finalidad analítica). En este caso, las cantidades de material empleadas son pequeñas.

Según la naturaleza de la fase estacionaria los métodos cromatográficos son de dos tipos: cromatografía plana y cromatografía en columna, las cuales están basadas en los mismos tipos de equilibrios.

La cromatografía de líquidos se puede realizar en columnas o en superficies planas, pero la cromatografía de gases y la cromatografía de fluidos supercríticos sólo se pueden realizar en columna.

2.2.7.7.1. Cromatografía plana

En la cromatografía plana la fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son:

- ✓ Cromatografía en papel
- ✓ Cromatografía en capa fina

Cromatografía en papel.

Es la más sencilla de las técnicas, pero sólo nos dará resultados cualitativos. El método se basa en un mecanismo de reparto, y consiste en depositar una pequeña cantidad de muestra en el extremo de una tira de papel de filtro, que se deja evaporar (figura 2.18.); luego se introduce la tira en una cámara contenga el disolvente (figura 2.17), de manera que éste fluya por la tira por capilaridad.

Cuando el disolvente deja de ascender o ha llegado al extremo, se retira el papel y seca. Si el disolvente elegido fue adecuado y las sustancias tienen color propio se verán las manchas de distinto color separadas. Cuando los componentes no tienen color propio el papel se somete a procesos de revelado.

Hay varios factores de los cuales depende una cromatografía eficaz: la elección del disolvente y la del papel de filtro. (Ríos, 2009)

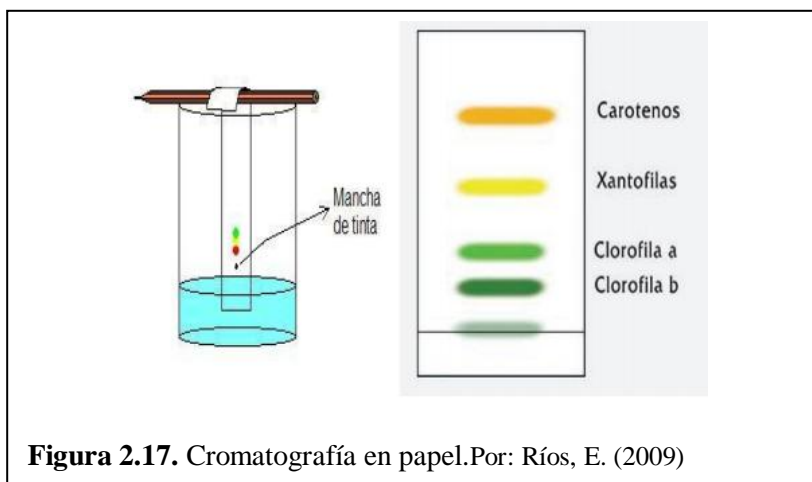


Figura 2.17. Cromatografía en papel. Por: Ríos, E. (2009)

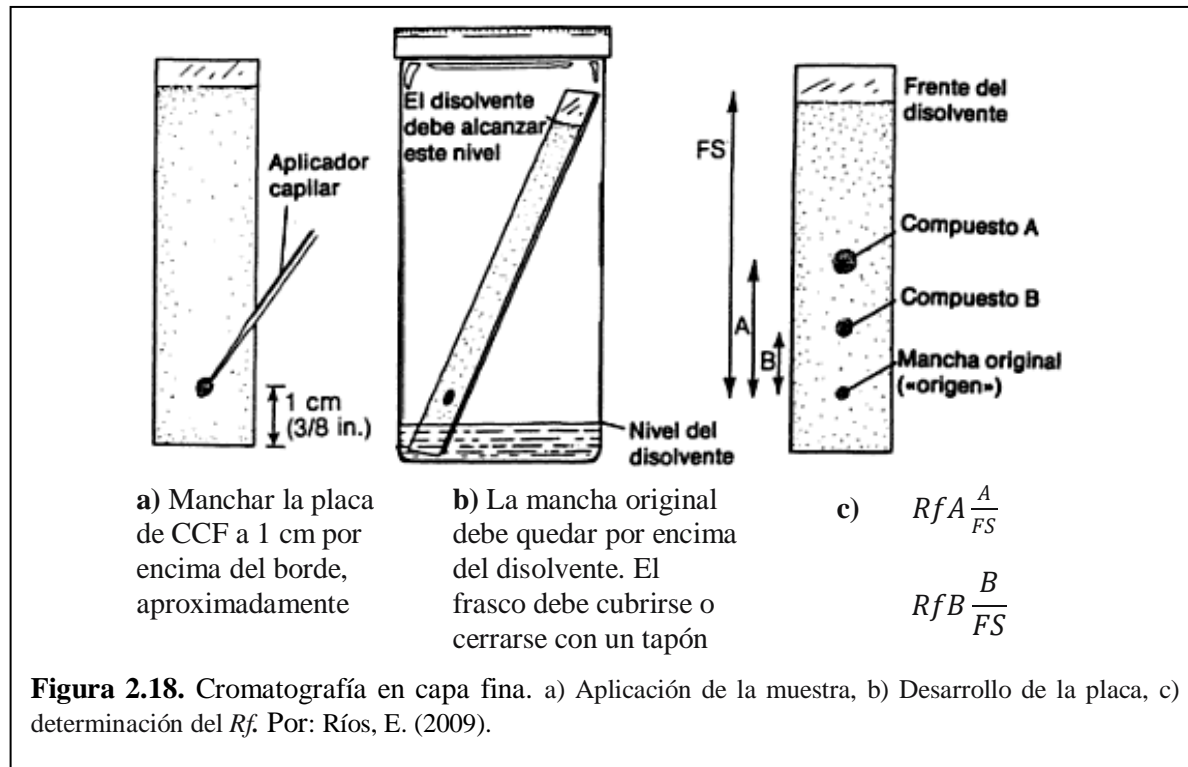
Cromatografía en capa fina

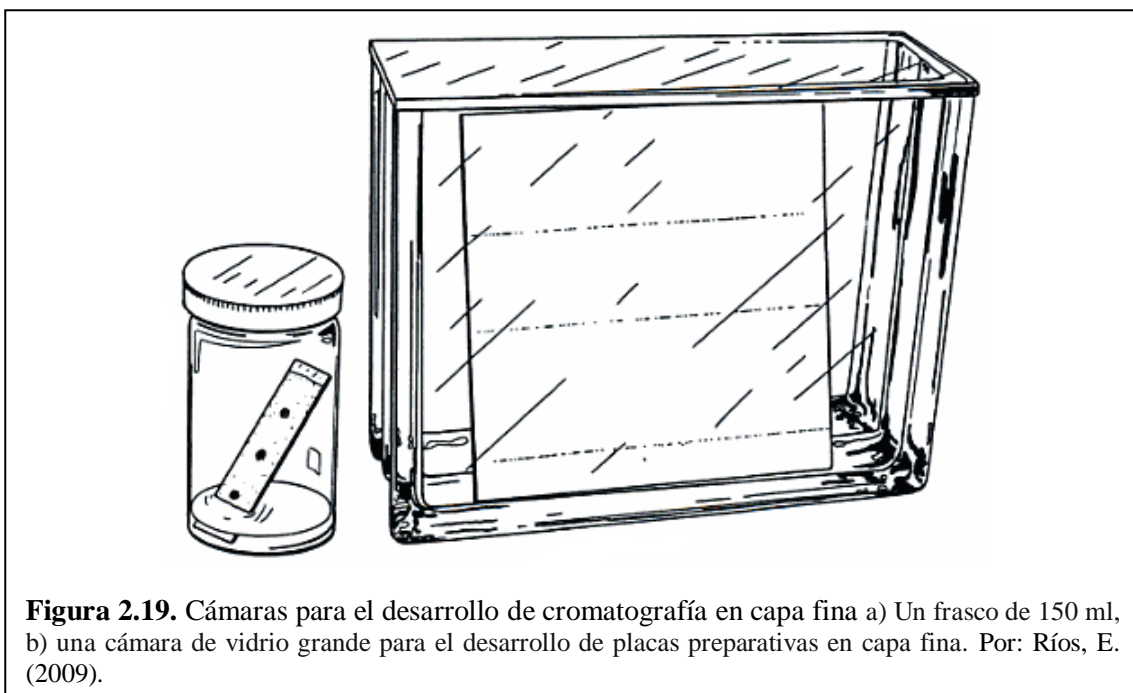
La cromatografía en capa fina (figura 2.18.) se basa en la preparación de una capa uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cámara que contiene la fase móvil (figura 2.19), que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa esta se saca y se visualiza.

La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como R_f (rate factor).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$





La búsqueda del eluyente requiere probar con varios disolventes de diferente polaridad o con mezclas. Para compuestos poco polares, que se desplazan con mucha facilidad, se debe utilizar un disolvente apolar como el hexano y en el caso de compuestos de polaridad media, mezclas de hexano y acetato de etilo.

La mayoría de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los componentes activos a la luz ultravioleta (254 nm). En el caso de componentes que no absorban a la luz ultravioleta, la visualización requiere utilizar un agente revelador. El revelador reacciona con los productos proporcionando productos coloreados.

Tanto en la cromatografía en papel, como la cromatografía en capa fina se tiene que determinar la posición en donde se hallan situadas las zonas o manchas de sustrato.

Si los componentes de la muestra (manchas) no son coloreados, se requiere de métodos que nos permitan visualizarlos componente presentes; este procedimiento también se conoce este como “revelado de la placa”.

El revelado de las placas se puede realizar mediante dos métodos:

- ✓ Método químico (por inmersión o rociado de reactivos coloreantes). Se obtienen derivados coloreados o fluorescentes de los componentes de la muestra.
- ✓ Método físico (ópticos). Generalmente se utiliza mediante la radiación con luz UV a la placa cromatográfica a 254nm y/o 365nm (figura 2.20.).

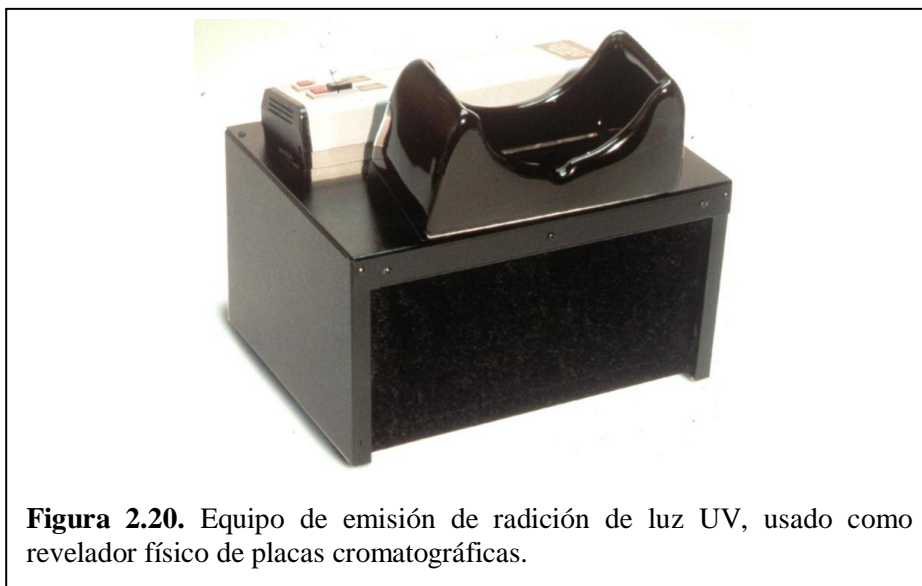


Figura 2.20. Equipo de emisión de radiación de luz UV, usado como revelador físico de placas cromatográficas.

La cromatografía en capa fina como método cualitativo y cuantitativo, siempre requiere contar con un estándar de referencia para comparar su valor de factor de retardo (R_f) y el color de la mancha del estándar al ser revelada con agentes químicos, con los datos experimentales obtenidos.

El factor de retardo (R_f) es un valor relativo par a cada sustancia y depende de las condiciones cromatográficas con que se haya trabajado (fase móvil, fase estacionaria, eluyente y el tiempo de saturación). Se define como el cociente entre la distancia recorrida por el centro de la mancha y la distancia recorrida simultáneamente por la fase móvil. (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa, & Galeano, 2008)

Cromatografía preparativa en placa.

La cromatografía preparativa se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio. Se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de una mezcla en cantidades comprendidas entre 100-200 mg.

En la superficie del adsorbente (gel de sílice), mediante una pipeta Pasteur, se traza una línea continua con la muestra disuelta y se introduce la placa en posición vertical en una cámara de vidrio, como se muestra en la figura 19. Durante la elución debe permanecer tapada para evitar la evaporación del disolvente. Una vez se han separado los productos que componen la muestra, se marca con una cuchilla el contorno del compuesto a aislar y con ayuda de una espátula se desprende del soporte de vidrio el gel de sílice con el compuesto adsorbido. Una vez transferido a un erlenmeyer se añade un disolvente en el cual sea soluble el producto, se filtra el gel de sílice y una vez eliminado el disolvente tenemos el producto puro.

2.2.7.7.2. Cromatografía en columna

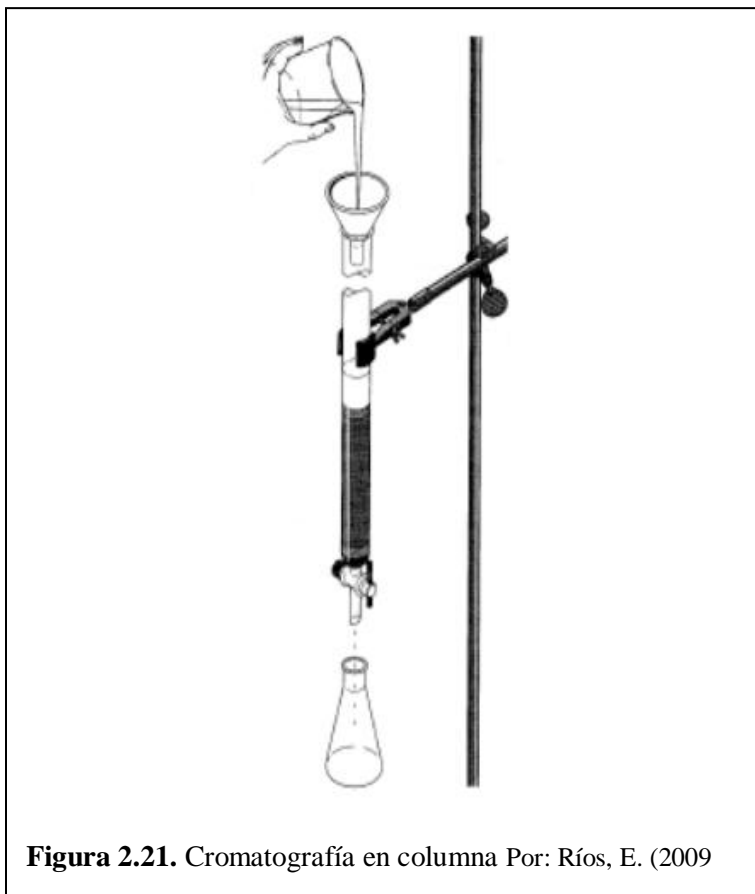
Skoog (2001) indica que es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánicos a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema por presión o gravedad. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente (figura 2.21). El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención.

El adsorbente más utilizado para cromatografía de columna es gel de sílice, aunque también se puede emplear alúmina y florisil. La elución de la cromatografía puede realizarse por gravedad o mediante presión (*Flash chromatography*), la diferencia en ambos casos está en el tamaño de las partículas de gel de sílice (0,063-0,200 nm, sílice de columna, 0,040-0,063 nm, sílice flash). Debido a que la disminución del tamaño de las partículas de adsorbente conduce a una separación más eficaz, la cromatografía a media presión (flash) proporciona mejores resultados, además de ser más rápida. (Albán & Ramos, 2011)

Las variables que más influyen en la eficacia de la separación en cromatografía de columna y utilizando gel de sílice como adsorbente son las siguientes:

- a) Diámetro de la columna y cantidad de gel de sílice. La altura del adsorbente está relacionada con la diferencia de R_f de los componentes de la mezcla. El diámetro de la columna con la cantidad de producto a separar.

- b) Elección del disolvente. El disolvente tienen que conducir a una buena separación de los componentes de la mezcla en capa fina, utilizándose en muchos casos mezclas de disolventes y se realiza una elución en gradiente. Una de las mezclas más utilizadas es hexano/acetato de etilo.



En la tabla. 2.3. se muestra la clasificación de la cromatografía en columna, como se indica, los métodos cromatográficos se dividen en tres categorías según la naturaleza de la fase móvil. Los tres tipos de fases móviles son: líquidos, gases y fluidos supercríticos, la segunda columna de la tabla indica que hay cinco tipos de cromatografía de líquidos y tres tipos de cromatografía de gases, que difieren en la naturaleza de la fase estacionaria y en los tipos de equilibrio que existen entre las fases.

Tabla 2.3. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquido)	Líquido – líquido, o de reparto	Líquido adsorbido en un sólido	Reparto entre líquidos inmiscibles
	Líquido – fase enlazada	Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre líquido y superficie químicamente modificada
	Líquido – sólido o de adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un polímero sólido	Reparto/tamizado
Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas)	Gas – líquido	Líquido adsorbido en un sólido	Reparto entre un gas y un líquido
	Gas – fase enlazada	Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre un gas y una superficie químicamente modificada
	Gas – sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluidos supercrítico)		Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto de fluido supercrítico y superficie químicamente modificada

Nota: Skoog, D. (2001). *Fundamentos de química analítica*.p.664

Según el tipo de interacción que se establece entre los componentes de la mezcla y la fase móvil y estacionaria podemos distinguir:

- a) **Cromatografía de adsorción.** La fase estacionaria es un sólido polar capaz de adsorber a los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar.
- b) **Cromatografía de partición.** La separación se basa en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en las fases estacionaria y móvil, que son ambas líquidas.
- c) **Cromatografía de intercambio iónico.** La fase estacionaria es un sólido que lleva anclados grupos funcionales ionizables cuya carga se puede intercambiar por aquellos iones presentes en la fase móvil.

2.2.7.7.3. Disolventes más comunes usados en cromatografía

En la tabla 2.4. se muestran las propiedades más comunes de los disolventes más usados en cromatografía.

Tabla 2.4. Disolventes más usados en cromatografía

Disolvente	Fórmula química	Punto de ebullición	Constante dieléctrica	Densidad g/ml
Disolventes no polares				
Hexano	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	69	2,0	0,655
Benceno	C_6H_6	80	2,3	0,879
Tolueno	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_3$	111	2,4	0,867
Éter dietílico	$\text{CH}_3\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	35	4,3	0,713
Cloroformo	CHCl_3	61	4,8	1,498
Acetato de etilo	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	77	6,0	0,894
Disolventes polares apróticos				
1,4-dioxano	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$	101	2,3	1,033
Tetrahidrofurano (THF)	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	66	7,5	0,886
Diclorometano (DCM)	CH_2Cl_2	40	9,1	1,326
Acetona	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$	56	21	0,786
Acetonitrilo	$\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{N}$	82	37	0,786
Dimetilformamida (DMF)	$\text{H}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$	153	38	0,944
Dimetilsulfóxido (DMSO)	$\text{CH}_3-\text{S}(=\text{O})-\text{CH}_3$	189	47	1,092
Disolventes polares protóticos				
Ácido acético	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	118	6,2	1,049
n-butanol	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	118	18	0,810
Isopropanol (IPA)	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$	82	18	0,785
n-propanol	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	97	20	0,803
Etanol	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{OH}$	79	24	0,789
Metanol	CH_3-OH	65	33	0,791
Ácido fórmico	$\text{H}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	100	58	1,210
Agua	$\text{H}-\text{O}-\text{H}$	100	82	1,000

Nota: Albán, M., & Ramos, P. (2011). *ocw.uv.es*. Recuperado el 10 de Marzo de 2013, de http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf

Usualmente es un buen procedimiento comenzar la prueba de una mezcla problema con el disolvente menos polar disponible. Si no se observara ningún desarrollo con un disolvente como hexano, debería intentarse con otro más polar (por ejemplo, éter). Si la muestra se mueve con el frente del disolvente éter, debe emplearse un disolvente de polaridad intermedia entre el hexano y el éter. El disolvente intermedio podrá ser una sustancia única (ejemplo: diclorometano o tolueno), o la polaridad del

disolvente puede ajustarse mezclando éter y hexano, la figura 2.22. muestra esquemáticamente este proceso (Durst & Gokel, 2007)

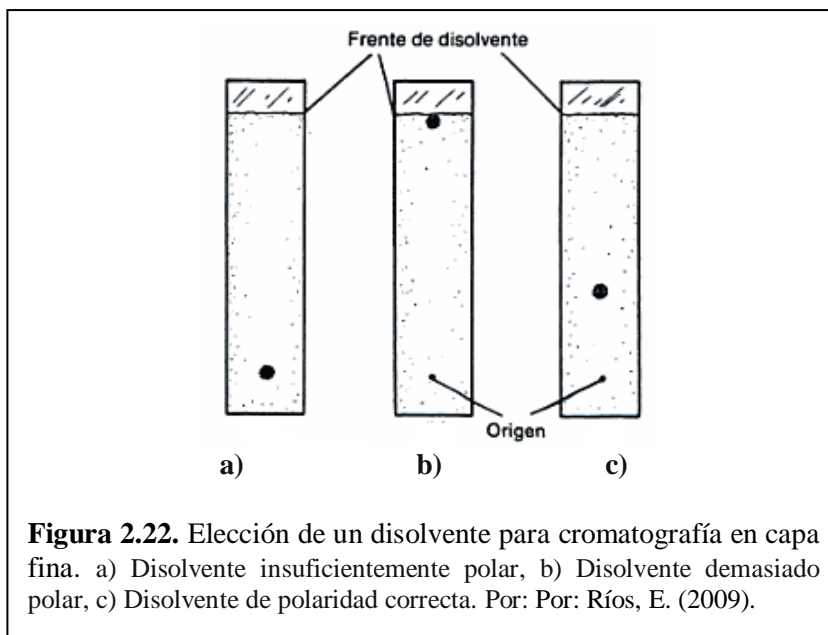


Figura 2.22. Elección de un disolvente para cromatografía en capa fina. a) Disolvente insuficientemente polar, b) Disolvente demasiado polar, c) Disolvente de polaridad correcta. Por: Ríos, E. (2009).

2.2.7.7.4. Términos empleados en cromatografía

- ✓ Analito: es la sustancia que se va a separar durante la cromatografía.
- ✓ Cromatografía analítica: se emplea para determinar la existencia y posiblemente también la concentración de un analito en una muestra.
- ✓ Cromatograma: es el resultado gráfico de la cromatografía. En el caso de separación óptima, los diferentes picos o manchas del cromatograma se corresponden a los componentes de la mezcla separada.
- ✓ Cromatógrafo: es el equipo que permite una separación sofisticada. Por ejemplo, un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de líquidos.
- ✓ Cromatografía: es el método físico de separación en el cual los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida.
- ✓ Efluente: es la fase móvil que atraviesa la columna.
- ✓ Serie eluotrópica: es una lista de disolventes clasificados según su poder de dilución.
- ✓ Fase inmovilizada es una fase estacionaria que está inmovilizada sobre partículas de soporte, o en la pared interior del tubo contenedor o columna.

- ✓ Fase móvil: es la fase que se mueve en una dirección definida. Puede ser un líquido (cromatografía de líquidos o CEC), un gas (cromatografía de gases) o un fluido supercrítico (cromatografía de fluidos supercríticos). La fase móvil consiste en la muestra que está siendo separada/analizada y el disolvente, que se mueven por el interior de la columna. En el caso de la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, la fase móvil es un disolvente no-polar como el hexano (fase normal) o bien algún disolvente polar (cromatografía de fase reversa) y la muestra que va a ser separada. La fase móvil se mueve a través de la columna de cromatografía (fase estacionaria) de forma que la muestra interacciona con la fase estacionaria y se separa.
- ✓ Cromatografía preparativa: se usa para purificar suficiente cantidad de sustancia para un uso posterior, más que para análisis.
- ✓ Tiempo de retención: es el tiempo característico que tarda un analito particular en pasar a través del sistema (desde la columna de entrada hasta el detector) bajo las condiciones fijadas.
- ✓ Muestra: es la materia que va a ser analizada en la cromatografía. Puede consistir en un simple componente o una mezcla de varios. Cuando la mezcla es tratada en el curso del análisis, la fase o fases que contienen los analitos de interés es llamada igualmente muestra mientras el resto de sustancias cuya separación no resulta de interés es llamada residuo.
- ✓ Solute: es cada uno de los componentes de la muestra que va a ser separado.
- ✓ Disolvente: es toda sustancia capaz de solubilizar a otra, y especialmente la fase líquida móvil en cromatografía de líquidos.
- ✓ Fase estacionaria: es la sustancia que está fija en una posición en el procedimiento de la cromatografía. Un ejemplo es la capa de sílica en la cromatografía en capa fina. (Durst & Gokel, 2007)

2.2.7.8. Espectroscopía

Cuando se aísla un compuesto orgánico cuyo estudio en general es de interés, una de las más importantes tareas del investigador es determinar su estructura molecular.

La identificación de un compuesto químico se ha llevado por medio de reacciones químicas; sin embargo, este tipo de análisis destruye las muestras y considerando que muchas veces, la materia de análisis es muy pequeña, se hizo necesario desarrollar técnicas que permite un avanzado análisis de sustancias, sin destruirlas, como el método de espectroscopia.

Esta técnica consiste en el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, con absorción o emisión de energía radiante. Para la determinación de estructuras moleculares de compuestos orgánicos se utilizan diferentes tipos de espectroscopia (tabla 2.5):

Tabla 2.5. Espectro electromagnético

Región	Longitud de onda	Energía de excitación (Kcal/mol)	Tipo de excitación
Radiación gamma, rayos X, rayos cósmicos	<100 nm	>286 kcal	
Ultravioleta Vacío	100-200 nm	286-143 kcal	Electrónica
Cuarzo	200-350 nm	143.82 kcal	Electrónica
Visible	350-800 nm	82-36 kcal	Electrónica
Infrarrojo próximo	0,8-2,0 μ m	36-14,3 kcal	Armónicos de deformaciones de enlace
Infrarrojo	2-16 μ m	14,3-1,8 kcal	Deformaciones de enlace
Infrarrojo lejano	16-300 μ m	1,8-0,1 kcal	Deformaciones de enlace
Microondas	1 cm	10-4 kcal	Rotacional
Radiofrecuencias	Metros	10-6 kcal	Transiciones de spin nuclear y electrónico

Nota: Cava, Jongh, D., Johnson, Lebel, & Stevens. (1971). *Química orgánica* (2a ed.).p. 288

2.2.8.1. Espectroscopía Ultravioleta (UV)

Es una espectroscopia de emisión de fotones y una espectrofotometría. Utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, la radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

La espectroscopia UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia.

Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.

Se utiliza extensivamente en laboratorios de química y bioquímica para determinar pequeñas cantidades de cierta sustancia, como las trazas de metales en aleaciones o la concentración de cierto medicamento que puede llegar a ciertas partes del cuerpo.

2.2.8.2. Espectroscopia Infrarroja (IR)

Esta cubre un conjunto de técnicas, siendo la más común una forma de espectroscopia de absorción. Así como otras técnicas espectroscópicas, puede usarse para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra.

La radiación infrarroja es la radiación electromagnética que cubre el intervalo desde justo arriba del visible ($7.8 \times 10^{-7} \text{ m}$) a aproximadamente 10^{-4} m , pero únicamente la porción media desde $2.5 \times 10^{-6} \text{ m}$ a $2.5 \times 10^{-5} \text{ m}$ es utilizada por los químicos orgánicos (figura 2.23.). Por lo regular las longitudes de onda en la región IR se dan en micrómetros ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$), y las frecuencias se dan en números de onda en lugar de hertz. El número de onda ($\tilde{\nu}$) es el recíproco de la longitud de onda en centímetros, y por lo tanto se expresa en unidades de cm^{-1}

$$\text{número de onda } \mu(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})}$$

Por lo tanto, la región del IR útil es de 4000 a 400 cm^{-1} , que corresponde a las energías de 48.0 kJ/mol a 4.8 kJ/mol (11.5 - 1.15 kcal/mol) (McMurry, 2008)

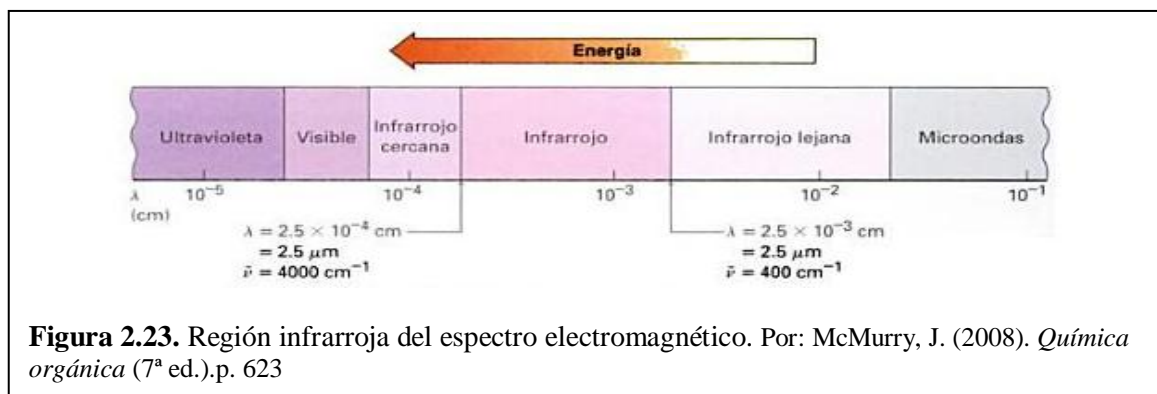
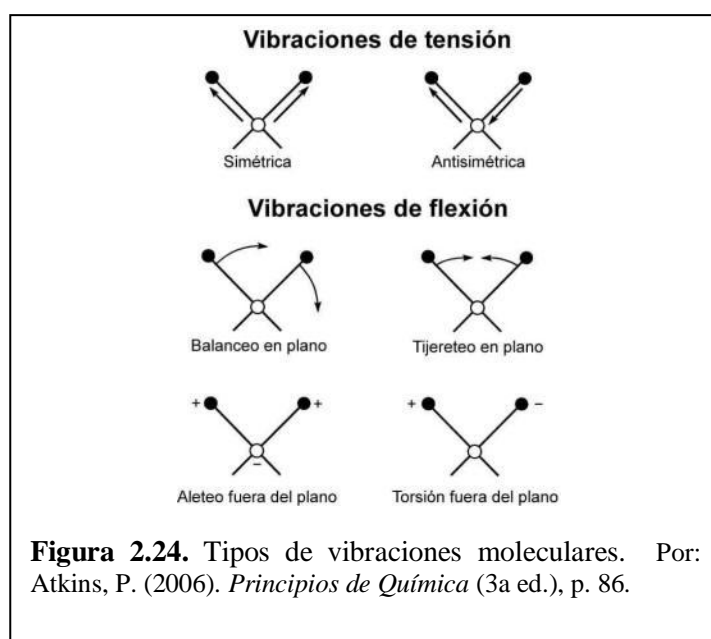


Figura 2.23. Región infrarroja del espectro electromagnético. Por: McMurry, J. (2008). *Química orgánica* (7ª ed.).p. 623

Esta espectroscopia se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Cualquier enlace entre dos átomos vibra a medida que los átomos se acercan y se alejan uno del otro. Este tipo de movimiento se llama “tensión”. Las moléculas poliatómicas pueden sufrir además vibraciones de “flexión” en las cuales los ángulos de entre los enlaces periódicamente aumentan y disminuyen. La frecuencia a la cual las moléculas vibran dependen de las masas de sus átomos y de la rigidez de sus enlaces: una molécula formada por átomos livianos unidos por enlaces rígidos tiene una frecuencia vibracional más alta que una formada por átomos pesados unidos por átomos más flojos y absorberá a radiaciones de frecuencias más bajas. (Atkins, 2006)

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. En la figura 2.24. se representan los diferentes tipos de vibraciones moleculares.



En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como O_2 y Br_2) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo.

De esta forma, analizando cuales son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia.

La espectroscopia infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo: detección de las moléculas presentes en el material.

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados. (Billmeyer, 2004)

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda comprendidas entre 1300 y 400 cm^{-1} (infrarrojo lejano), la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.). En esta zona de longitudes de onda, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción. En la figura 2.25. se indican las bandas de absorción de IR más comunes.

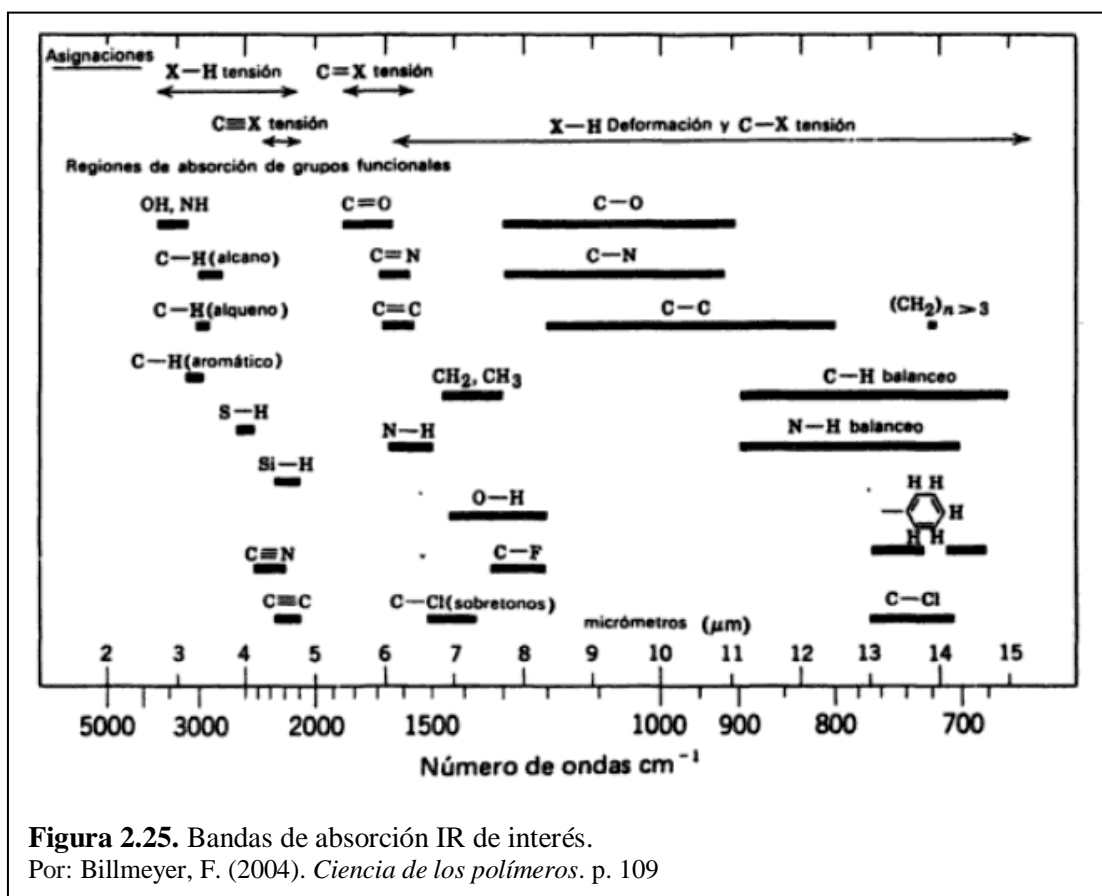


Figura 2.25. Bandas de absorción IR de interés.
Por: Billmeyer, F. (2004). *Ciencia de los polímeros*. p. 109

2.2.8.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos.

Algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias; como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos.

Para que se pueda emplear la técnica los núcleos deben tener un-momento magnético distinto de cero. Esta condición no la cumplen los núcleos con número másico y número atómico par (como ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S). Los núcleos más importantes en química orgánica son: ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F y ^{15}N .

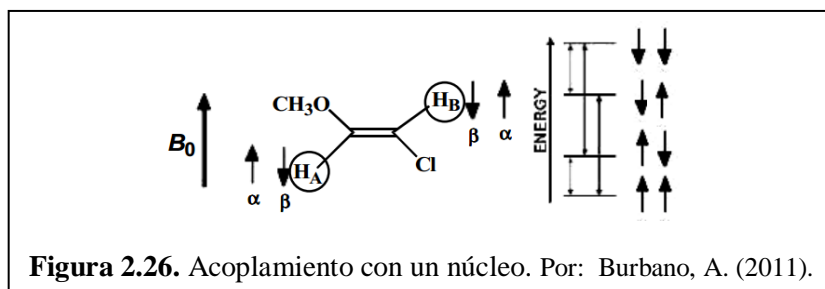
Se prefieren los núcleos de número cuántico de espín nuclear igual a $1/2$, ya que carecen de un momento cuadrupolar eléctrico que produce un ensanchamiento de las señales de RMN. También es mejor que el isótopo sea abundante en la naturaleza, ya que la intensidad de la señal dependerá de la concentración de esos núcleos activos. Por eso, uno de los más útiles en la elucidación de estructuras es el ^1H , dando lugar a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón. También es importante en química orgánica el ^{13}C , aunque se trata de un núcleo poco abundante y poco sensible.

Interacción Espín-Espín. Constantes de Acoplamiento

La forma con la que aparece una señal en RMN puede verse alterada cuando existen otros núcleos magnéticos en su entorno más cercano.

Acoplamiento con un Núcleo

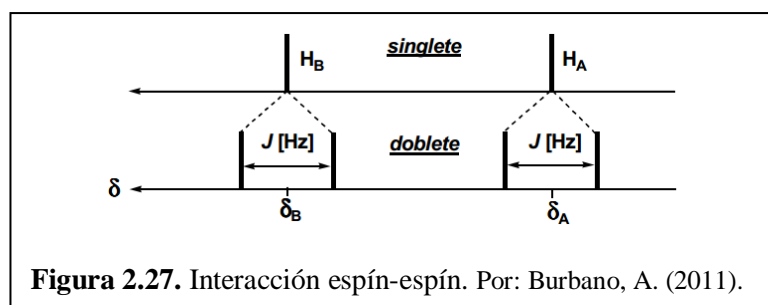
Debido a la presencia del campo magnético externo B_0 , cada uno de los protones A y B podrá estar en dos estados de espín diferentes α y β . El campo efectivo que va a sentir por ejemplo H_A va a ser diferente según H_B se encuentre en uno u otro estado de espín, por lo que H_A va a aparecer a dos desplazamientos distintos. Lo mismo le ocurrirá a H_B ; en la figura 2.26. se esquematiza el acoplamiento con un núcleo.



En términos energéticos, habrá cuatro posibles transiciones electrónicas que darán lugar a cuatro señales en el espectro, es decir, cada señal original se va a desdoblar en otras dos.

A este efecto se le denomina interacción espín-espín (figura 2.27.) y se define como la influencia de espines vecinos en la multiplicidad de una determinada señal, en donde:

- Un protón aislado aparecerá como una única señal denominada singlete.
- Un protón acoplado con otro aparecerá como un doblete.
- La distancia entre dos picos para la resonancia de un núcleo que interacciona con otro es una medida de la magnitud con la que cada espín nuclear influencia al otro y se denomina constante de acoplamiento, cuyo símbolo es J y se mide siempre en Hertzios nunca en ppm.



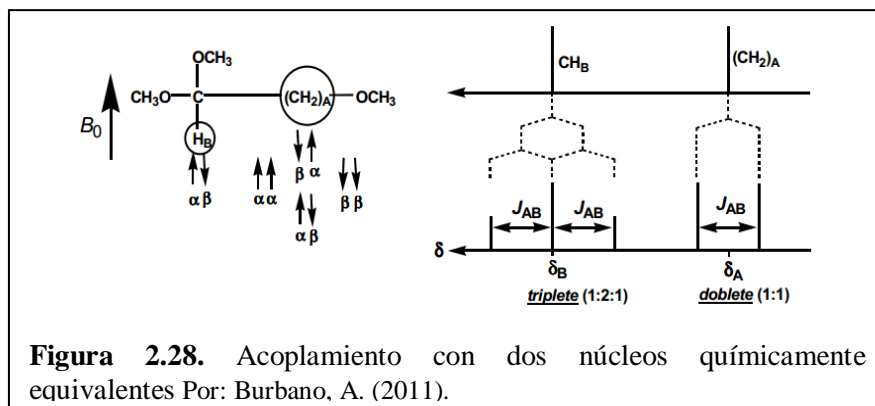
Principales Características de las Constantes de Acoplamiento (J)

- 1) El valor de una J siempre es el mismo para un determinado compuesto independientemente del campo magnético aplicado.
- 2) El valor de una J va a depender del número de enlaces que hay entre los núcleos que se acoplan, del tipo de enlace e incluso de los ángulos de enlace.
- 3) El efecto del acoplamiento decae notablemente a medida que el número de enlaces entre los núcleos acoplados aumenta. Normalmente no se observan cuando hay más de 3 enlaces (hay excepciones).
- 4) No se observan acoplamientos espín-espín intermoleculares, es decir, entre núcleos magnéticos de diferentes moléculas.
- 5) No se observan acoplamientos espín-espín entre núcleos químicamente equivalentes

Acoplamiento con Dos Núcleos Químicamente Equivalentes

Los dos protones del grupo $(CH_2)_A$ son químicamente equivalentes por lo que no se van a acoplar entre sí y aparecerán como un doblete por acoplamiento con el H_B , que se podrá encontrar en sus dos estados de espín α y β .

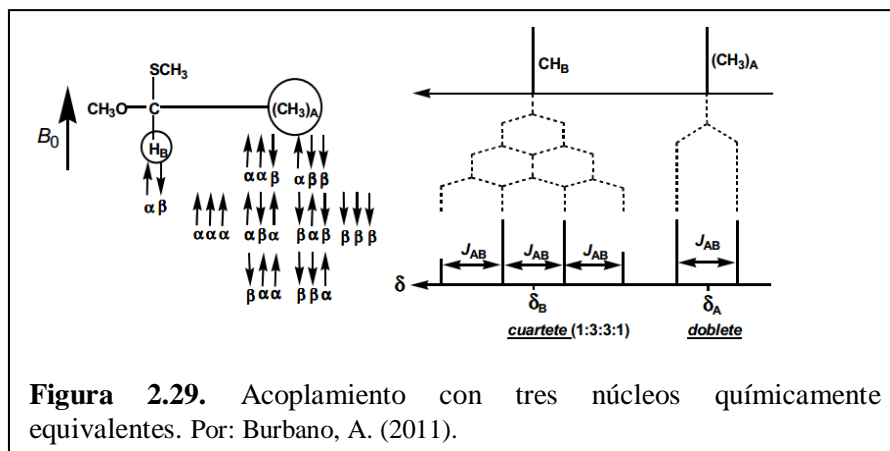
Los dos protones H_A , podrán encontrarse en los estados de espín siguientes: dos antiparalelos ($\beta\alpha$ y $\alpha\beta$), que se cancelan entre sí por lo que su señal de resonancia aparecerá a la misma frecuencia que si no hubiera acoplamiento, y dos paralelos ($\alpha\alpha$ y $\beta\beta$) de la misma magnitud pero signo opuesto que dan lugar a otras dos señales con la mitad de intensidad. El resultado final es un triplete de intensidad 1:2:1 siendo la distancia entre dos líneas la constante de acoplamiento entre A y B (J_{AB}). Se podrán medir 2 constantes de acoplamiento que en este caso serán iguales (figura 2.28).



Acoplamiento con Tres Núcleos Químicamente Equivalentes

En este caso, el grupo $(CH_3)_A$, que se acopla con H_B con una constante de acoplamiento J_{AB} , aparecerá como un doblete que integrará para 3 protones.

Por su parte el H_B que se acopla con los 3 protones del grupo $(CH_3)_A$ aparecerá como un cuartete de intensidades 1:3:3:1 que integrará para 1 protón. En este caso se podrán medir 3 constantes J_{AB} que serán iguales debido a la equivalencia de los 3 protones del grupo metilo (figura 2.29).



Espectros de R. M. N. de Primer y Segundo Orden

Para que un espectro se considere de primer orden se debe cumplir que la diferencia de frecuencias ($\Delta\nu$) medida en Hz entre los desplazamientos químicos de cualquier par de núcleos sea mucho más grande que el valor de la constante de acoplamiento (J) entre ellos.

$$\Delta\nu[\text{Hz}] \gg J \leftarrow \text{Espectros de primer orden} \rightarrow \Delta\nu/J > 10 - 15$$

Para espectros de Primer Orden, tanto los desplazamientos químicos como la multiplicidad y la intensidad de las señales se pueden deducir directamente a partir del espectro.

Características de los Espectros de Primer Orden

- 1) Los núcleos químicamente equivalentes (por ejemplo los 3 protones de un grupo CH_3) no dan en el espectro ningún tipo de acoplamiento aparente.
- 2) La multiplicidad de la señal de un núcleo o grupo de núcleos equivalentes viene dada por la siguiente expresión:

$$\text{Multiplicidad} = (2 n_A I_A + 1)(2 n_B I_B + 1) \dots \dots \dots$$

n_A = número de núcleos con número cuántico de espín I_A que se acoplan con el núcleo observado con una constante de acoplamiento J_A .

n_B = número de núcleos con número cuántico de espín I_B que se acoplan con el núcleo observado con otra constante de acoplamiento J_B .

$$\text{Multiplicidad (RMN} - {}^1\text{H} = (n_A + 1)(n_B + 1) \dots \dots \dots$$

- 3) Para espectros de RMN- ${}^1\text{H}$ (o de cualquier núcleo con $I = 1/2$), la intensidad relativa de las señales dentro de cada multiplete originado por el acoplamiento con n núcleos viene dada por el triángulo de pascal o triángulo de tartaglia (tabla 2.6.).
- 4) Los valores de desplazamiento químico del núcleo o núcleos observados corresponde al centro del multiplete total.
- 5) Los valores de las constantes de acoplamiento (J_{AX} , J_{BX} , etc.) se pueden calcular directamente en el espectro como separaciones entre las señales adecuadas expresadas en Hertzios.

En la tabla 2.6 se observa las relaciones entre la multiplicidad, intensidades relativas cuando el valor de $n=0$, $n=1$, $n=2$; así como el nombre del multiplete

Tabla 2.6. Multiplicidades e Intensidades Relativas

n	multiplicidad	intensidades	nombre
0	1	1	Singulete
1	2	1 1	Doblete
2	3	1 2 1	Triplete
3	4	1 3 3 1	Cuartete
4	5	1 4 6 4 1	Quintete
5	6	1 5 10 10 5 1	Sextete
6	7	1 6 15 20 15 6 1	Septete

Nota: (Núcleos I = 1/2). PorSkoog, D. (2001). *Fundamentos de química analítica*, p. 567

Espectros de segundo orden

Cuando la diferencia de frecuencias (Hz) entre dos señales y su constante de acoplamiento no es muy grande el espectro se considera de segundo orden.

$$\Delta\nu[\text{Hz}] \gg J \leftarrow \text{Espectros de segundo orden} \rightarrow \Delta\nu/J < 10 - 15$$

Características de los espectros de segundo orden

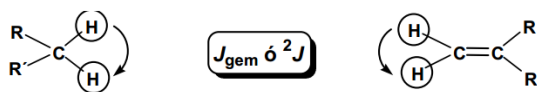
- 1) Los multipletes pierden su simetría y las intensidades no siguen una regla del triángulo de pascal. A veces puede ser útil el llamado “efecto techo” para aclarar hacia qué zona del espectro están los protones con los que se acopla cada núcleo.
- 2) En determinados casos no se van a poder medir directamente del espectro ni los desplazamientos químicos ni las constantes de acoplamiento sino que habrá que recurrir a cálculos matemáticos.

Tipos de constantes de acoplamiento

Las constantes de acoplamiento ^1H - ^1H se suelen dividir en tres grupos atendiendo a la distancia entre los protones que se acoplan.

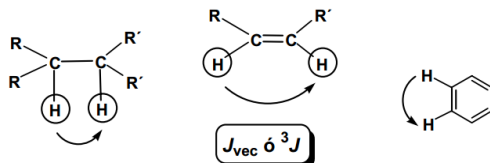
1) Constantes de acoplamiento geminales (J_{gem} o 2J)

Se dan entre protones separados por dos enlaces.



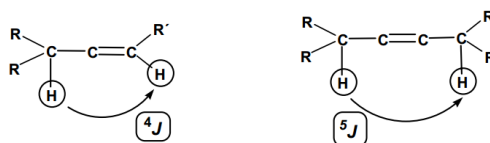
2) Constantes de acoplamiento vecinales (J_{vec} o 3J)

Se dan entre protones situados en carbonos vecinos, es decir, separados por tres enlaces.



3) Constantes de acoplamiento de largo alcance (4J , 5J ,...)

Se dan entre protones separados por más de tres enlaces.



Constantes de acoplamiento geminal

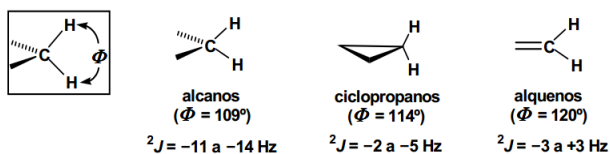
Normalmente son las de mayor valor absoluto y suelen tener signo negativo.

Se observan entre protones de un grupo CH_2 siempre que no sean químicamente equivalentes (moléculas rígidas o protones diastereotópicos).

La magnitud de estas constantes depende de varios factores:

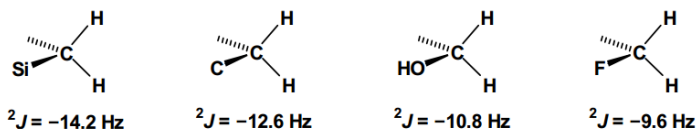
1) Ángulo de enlace H-C-H:

Cuanto mayor es el ángulo de enlace H-C-H más positiva es la constante geminal.

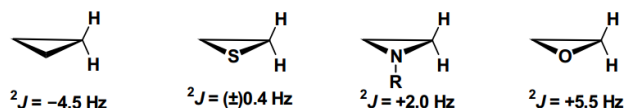


2) Electronegatividad de los sustituyentes:

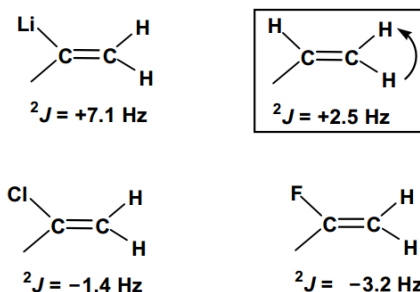
En sistemas alifáticos al aumentar la electronegatividad de los sustituyentes disminuye el valor de la constante geminal en valor absoluto.



En anillos de tres miembros, al aumentar la electronegatividad de los sustituyentes, la constante geminal pasa de ser negativa a positiva.

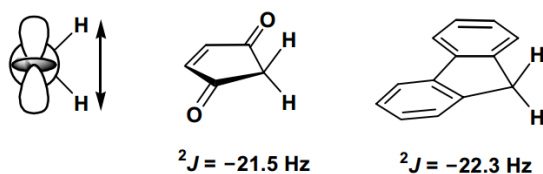


En sistemas olefínicos, al aumentar la electronegatividad de los sustituyentes, la constante geminal pasa de ser positiva a negativa.



3) Presencia de electrones π vecinos al carbón:

Provoca un aumento bastante grande en el valor absoluto con la constante geminal. Este efecto es máximo cuando la línea que une los protones que se acoplan es paralela al orbital π del sustituyente.



Constantes de acoplamiento vecinal

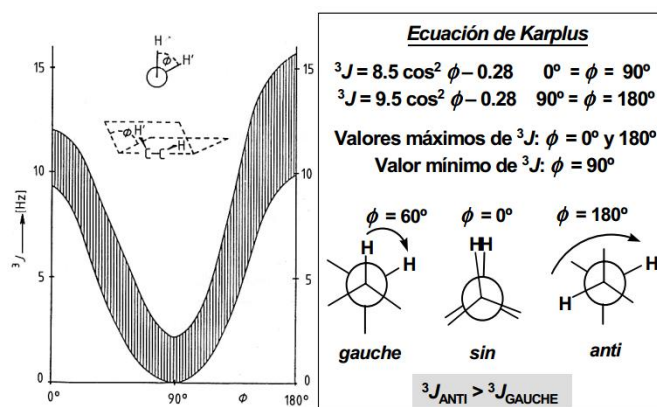
En general son siempre positivas

1) Sistemas saturados

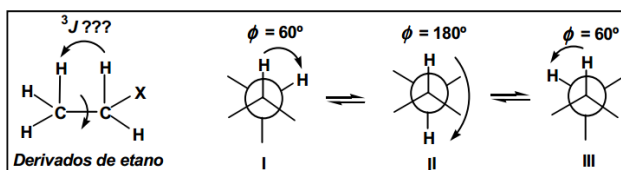
En sistemas saturados, su valor depende de dos factores principales; el ángulo diedro y la electronegatividad de los sustituyentes.

a) Valor del ángulo diedro

En 1959 Karplus encontró una relación matemática (dependencia sinusoidal) entre el valor de la constante vecinal y el ángulo diedro para sistemas alifáticos y alicíclicos sin sustituyentes electronegativos.



El uso más importante de las ecuaciones de Karplus ha estado en la determinación de las configuraciones y conformaciones de etanos sustituidos.



En los rotámeros I y III hay un acoplamiento gauche ($\phi = 60^\circ$) mientras que en el rotámero II existe un acoplamiento anti ($\phi = 180^\circ$). Si las poblaciones conformacionales de I, II y III son iguales, el valor de la constante de acoplamiento será una media aritmética dada por la siguiente ecuación:

$$3J_{\text{obs}} = 1/3 (^3J_{\text{gauche}} + ^3J_{\text{anti}} + ^3J_{\text{gauche}})$$

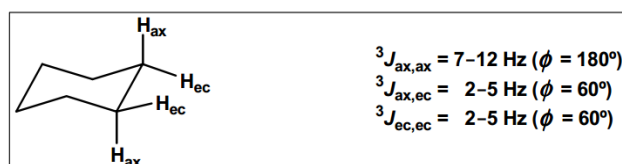
$$^3J (\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-X}) \sim 7 \text{ Hz}$$

Si las poblaciones conformacionales de cada rotámero son diferentes, el valor de la constante de acoplamiento vecinal vendrá dado por:

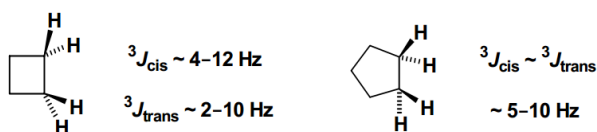
$$^3J_{\text{obs}} = X_1 ^3J_{\text{gauche}} + X_2 ^3J_{\text{anti}} + X_3 ^3J_{\text{gauche}}$$

X = fracción molar de cada rotámero

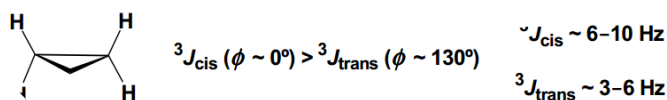
En el caso de cicloalcanos también se aplica la ecuación de Karplus fundamentalmente en ciclos de 6, donde se van a poder distinguir claramente protones en disposición axial y ecuatorial.



En ciclobutanos y ciclopentanos no existe un ángulo diedro fijo debido a la libertad conformacional por lo que las constantes cis y trans son bastante parecidas y normalmente no va a ser fácil distinguirlas.

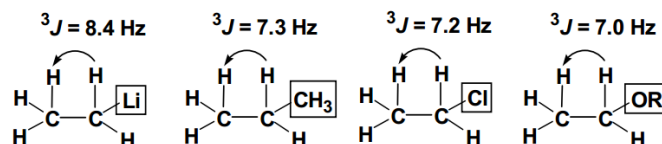


Sin embargo, en ciclopropanos, mucho más rígidos, también se podrán distinguir entre constantes de acoplamiento vecinales de tipo cis y trans.



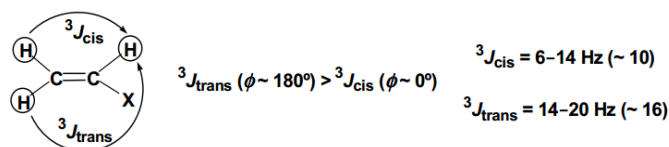
b) Efecto de los sustituyentes

En general, la presencia de sustituyentes electronegativos en los carbonos vecinos disminuye el valor de la constante de acoplamiento vecinal aunque el efecto no es muy grande.

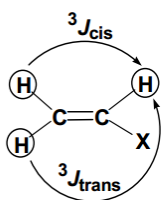


2) Sistemas Olefínicos

Vamos a poder distinguir perfectamente las constantes de acoplamiento vecinales entre protones que se encuentren en disposición cis y trans.

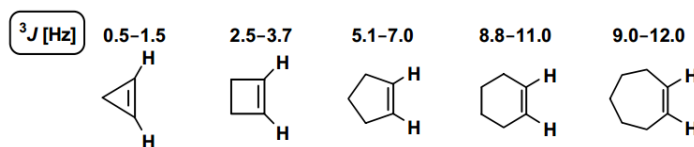


La presencia de sustituyentes electronegativos hace disminuir el valor de las constantes de acoplamiento vecinal tanto cis como trans.

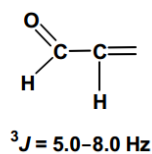
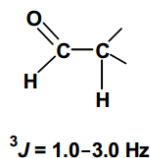


X	$^3J_{\text{cis}} [\text{Hz}]$	$^3J_{\text{trans}} [\text{Hz}]$
Li	19.3	23.9
SiR ₃	14.6	20.3
alquilo	10.4	17.4
OCH ₃	7.1	15.2
F	4.7	12.8

En cicloalquenos, la constante de acoplamiento cis va a depender mucho del tamaño del anillo. Cuanto más pequeño es el ciclo menor es el valor de 3J .



En aldehídos, el valor de la 3J con protones alifáticos suele ser bastante pequeña (1-3 Hz) mientras que aumenta con protones olefínicos (5-8 Hz).



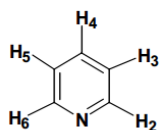
3) Sistemas Aromáticos y Heteroaromáticos

Los anillos aromáticos y heteroaromáticos son especiales ya que pueden presentar tanto constantes de acoplamiento vecinales (3J) como constantes de acoplamiento a largo alcance (4J y 5J).

En sistemas bencénicos las constantes orto, meta y para van a presentar valores muy diferentes lo que va a permitir conocer el tipo de sustitución de un anillo aromático a través de su espectro de RMN- 1 H.

En anillos de naftaleno se van a observar dos constantes de acoplamiento orto distintas entre los protones en posiciones 1 y 2, y en posiciones 2 y 3.

En sistemas heteroaromáticos las constantes de acoplamiento dependen de la electronegatividad del heteroátomo, las distancias de enlace y la distribución de carga en la molécula.



$^3J_{\text{orto}}$	H ₂ -H ₃	5-6 Hz
	H ₃ -H ₄	7-9 Hz
$^3J_{\text{meta}}$	H ₂ -H ₄	1-2 Hz
	H ₃ -H ₅	1-2 Hz
	H ₂ -H ₆	0-1 Hz
$^3J_{\text{para}}$	H ₂ -H ₅	0-1 Hz

En anillos de piridina también se cumple que las constantes orto son mayores que las meta y éstas que las para.

En heteroátomos de 5 eslabones (furano, tiofeno y pirrol) las diferencias entre las constantes orto, meta y para son mucho menores por lo que se va a hacer más difícil la asignación estructural.

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Esta investigación fue de tipo experimental, con el propósito de determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie *S. longicuspis*, mediante técnicas físicas y espectroscópicas, que generaron resultados que requirieron de análisis teórico detallado y con eventual aplicación práctica, ya que las sustancias que se aislaron y caracterizaron a partir de la especie *Sebastiania longicuspis* iniciarán posteriores investigaciones que pueden incidir en desarrollos tecnológicos

3.2. Población y muestra

Tomando en cuenta que se pretendió conocer los metabolitos secundarios que biosintetiza la especie de estudio, se colectó el material vegetal de varios individuos de la misma especie.

El material vegetal consistió en 1.292 kg en seco de hojas y 2.465 kg en seco de tallos. Se realizó la colecta de un solo lugar y de una sola población de la planta, con el fin de evitar las variaciones inherentes a la situación geográfica. Para la colecta de la planta se contó con personal capacitado en Botánica. Esta actividad se realizó en la localidad de Paso del Tigre localizada en el estado de Chiapas.

3.3. Diseño Experimental

Esta investigación abarcó procedimientos para el aislamiento y purificación mediante técnicas cromatográficas de los metabolitos secundarios presentes en el extracto diclorometano-metanol (1:1) de las hojas y los tallos de *S. longicuspis*. En este caso se montó cromatografía en columna y la elución se realizó aumentando la polaridad: Hexano, mezcla de Hexano:Acetato de Etilo, Acetato de etilo, Acetona.

Mediante métodos espectroscópicos (Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear) se determinó la estructura molecular de los compuestos purificados.

3.4. Materiales y Métodos

En la figura 3.1 se resumen el procedimiento realizado para la extracción y elucidación de los metabolitos secundarios de *S. longicuspis*.

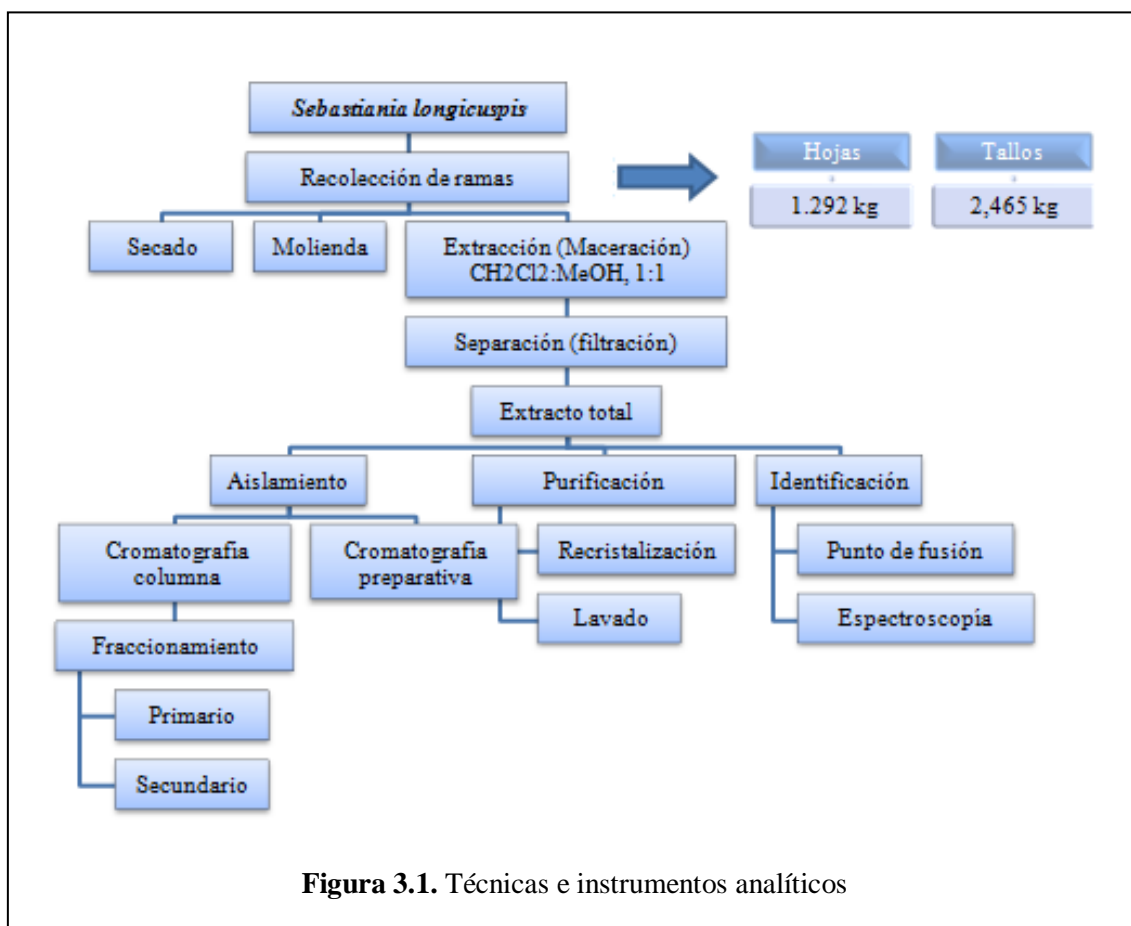


Figura 3.1. Técnicas e instrumentos analíticos

La presente investigación se basó en los siguientes pasos:

3.4.1. Material Vegetal

Las ramas de *Sebastiania longicuspis* se recolectaron en la localidad conocida como Paso del Tigre en el estado de Chiapas en México por personal capacitado en Agosto del 2012 y fue identificado por el Biólogo Esteban Martínez, Herbario Nacional MEXU donde se depositó un ejemplar de muestra con referencia: MEXU 39260.

3.4.2. Secado del material vegetal

Se realizó el procedimiento de secado a la sombra. Este procedimiento es importante para poder conservar la calidad, eliminar la humedad y así lograr evitar el enmohecimiento, acción de enzimas y bacterias.

3.4.3. Molienda

Con el propósito de preparar el extracto de diclorometano:metanol (1:1) y obtener una gran cantidad de componentes de la planta, fue necesario seguir un proceso de pulverización adecuado de las hojas y tallos de *S. longiscuspis*, ya que de esta manera aumentamos la superficie de contacto, para esto se utilizó un molino de rodillo. La figura 3.2. indica el proceso realizado para la disminución del tamaño de partícula de los tallos de *S. longiscuspis*



Figura 3.2. Disminución del tamaño de partícula del material vegetal (Tallos de *S. longiscuspis*).

3.4.4. Maceración

Una vez pesado y molido el material seco del material vegetal, se colocó una mezcla de disolventes en partes iguales de Diclorometano y Metanol en un frasco de vidrio de 25 litros de capacidad; la figura 3.3 indica este proceso. Se dejó en reposo a temperatura ambiente por 24 horas, se filtró, se recuperó el solvente y se repitió este procedimiento tres veces.



Figura 3.3. Preparación de los extractos crudos. a) Maceración ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$ 1:1), b) Filtración

3.4.5. Eliminación de solvente

Para eliminar el disolvente de la disolución y recuperar el soluto, se utilizó un rotavapor marca BUCHI (figura 3.4.), utilizando una temperatura de 50°C a . Finalmente se obtuvo el extracto concentrado de hojas y tallos de *Sebastiania longicuspis*



Figura 3.4. Eliminación del solvente en rotavapor.

3.4.6. Aislamiento y purificación

Para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios se utilizaron las siguientes técnicas:

3.4.6.1. Técnicas utilizadas para el aislamiento de metabolitos secundarios

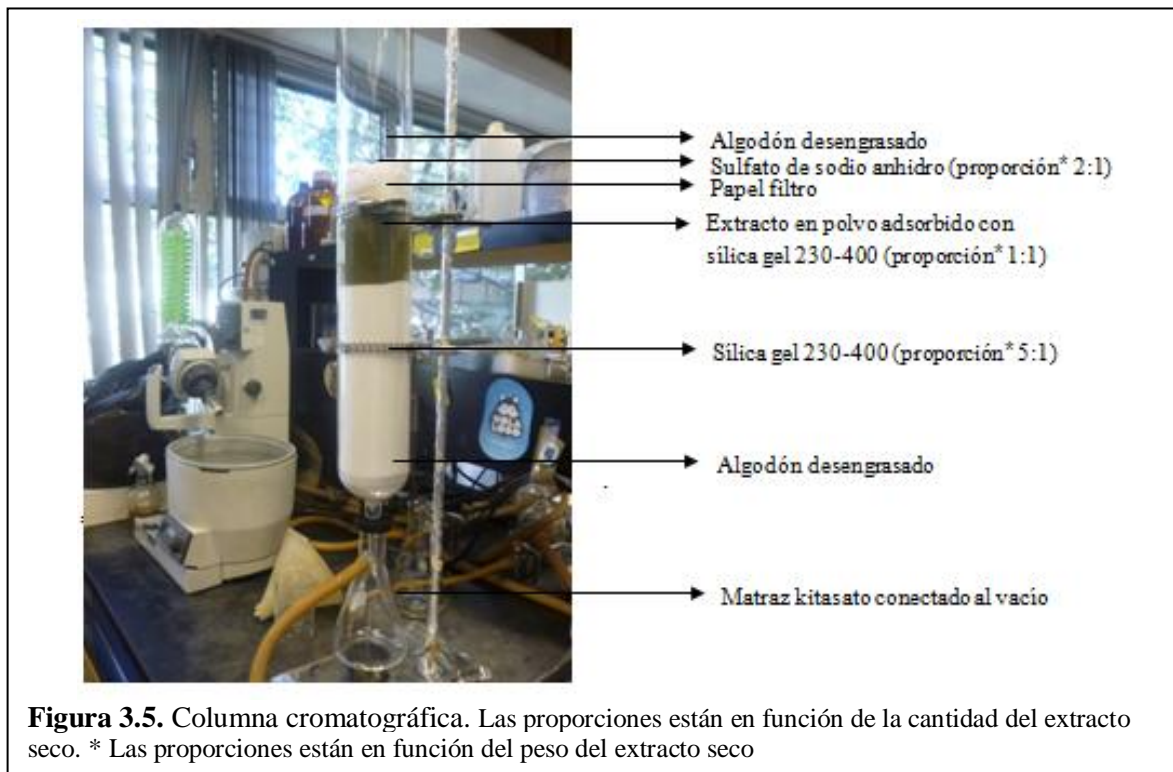
Las técnicas utilizadas para el aislamiento fueron: cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía en capa fina preparativa, a continuación se detallará el procedimiento realizado en cada una.

3.4.6.1.1. Cromatografía en columna

Este procedimiento se realizó en columna de vidrio que variaban de dimensiones, según el tipo de fraccionamiento. Para el fraccionamiento primario tanto de los extractos $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 1:1 de las hojas y de los tallos, las columnas fueron de 90 cm de longitud x 9 cm de diámetro, y para los fraccionamientos secundarios se utilizó columnas que variaban de dimensiones, según el peso de la muestra; utilizando columnas desde 1 cm hasta 9 cm de diámetro.

Se utilizó como fase estacionaria sílica gel de MN Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm / 230-400 mesh) marca MACHEREY-NAGEL y como fase móvil se utilizaron las mezclas de solventes adecuados en orden de polaridad creciente.

La figura 3.5. se resume el proceso del armado de la columna.



Se recolectaron fracciones según el tamaño de la columna, para la columna de 9cm de diámetro se recolectaron fracciones de 500 ml, para las otras columnas se fue disminuyendo el volumen de la fracción a 250 ml, 100 ml, 50 ml, dependiendo de la concentración de la muestra y de las placas cromatográficas previas, en las que se hayan identificado los metabolitos secundarios que se desean separar unos de otros.

Adsorción con sílica gel.

Este procedimiento se realizó al extracto concentrado, con una proporción uno a uno, se procedió a adsorber el extracto hasta que se obtuvo un polvo muy fino.

Finalmente se obtuvo 200 g de extracto en polvo de hojas y 40 g de extracto en polvo de tallos (figura 3.6).



Figura 3.6. Extracto en polvo de las hojas de *S. longicuspis*

3.4.6.1.2. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó en cromatofolios de aluminio TLC Sílica gel 60 F254 de marca MERCK de 20 cm x 20 cm, dependiendo del número de fracciones a compararse se utilizan de diferente dimensión (figura 3.7.). Se colocó la muestra con un capilar en puntos de aplicación señalados y se procedió a eluir, con el propósito de unificar las diferentes fracciones, verificar la pureza del compuesto y comparar con estándares en el laboratorio.

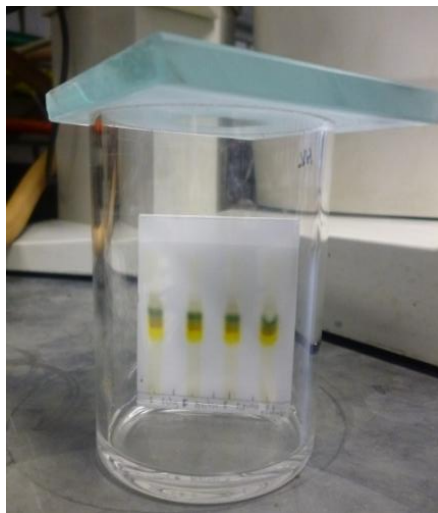


Figura 3.7. Cromatografía en capa fina. Se utilizó un cromatofolio de 5x4 cm y se procedió a la siembra de 7 muestras por cromatofolio.

3.4.6.1.3. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)

Se recurrió a cromatoplasmas TLC Sílica gel 60 F254 Aluminium sheets 20 x 20 cm de Merck, con base de vidrio.

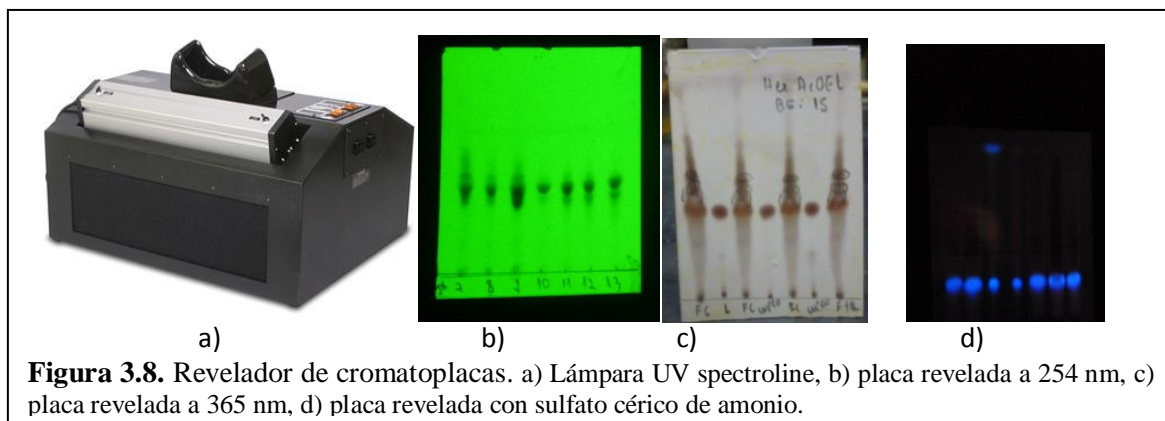
Las placas se observaron bajo una lámpara UV Spectroline modelo ENF- 240 (254 nm y 365 nm), se revelaron en una solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4 \text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$ al 1% en ácido sulfúrico 2N, como se indica en la figura 39 (d).

3.4.6.2. Instrumentos

A continuación se detallaran los instrumentos utilizados para la extracción y elucidación de los metabolitos secundarios de *S. longicuspis*.

3.4.6.2.1. Reveladores:

- Lámparas de rayos UV Spectroline ENF-240C (figura 3.8) las longitudes de onda utilizadas fueron 254 y 365 nm.



3.4.6.2.2. Punto de fusión

La determinación del punto de fusión se realizó en un Equipo Fisher-Johns de marca COLEPALMER (figura 3.9.); se colocó un cristal de la muestra en un cubreobjetos y se observó el rango de temperatura a la cual el compuesto puro cambie de estado físico. Se realizaron tres determinaciones para cada compuesto aislado.



3.4.7. Identificación de metabolitos secundarios

Para la identificación de los metabolitos secundarios se utilizaron los equipos de espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear; para la interpretación de los espectros se utilizó el programa informático MestReNova; a continuación se detallan cada uno de estos.

3.4.7.1. Espectroscopia Infrarroja (IR)

Los espectros de IR para los diferentes compuestos se obtuvieron en un equipo Bruker Tensor 27, Figura 3.10.(a). La forma de preparar de la muestra fue de acuerdo a la solubilidad del compuesto aislado.

3.4.7.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se obtuvieron espectros mediante diferentes técnicas ya sea unidimensionales RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT, o bidimensionales como son: COSY, NOESY, HSQC y HMBC.

Los espectros de RMN ^1H a 500 MHz y los de RMN ^{13}C , DEPT a 125 MHz se obtuvieron en un espectrómetro VARIAN, Unity Plus 300, Varian, Unity Inova 500 Hz, como se indica en la figura 3.10, los experimentos adicionales de 2D se realizaron a 500 MHz.

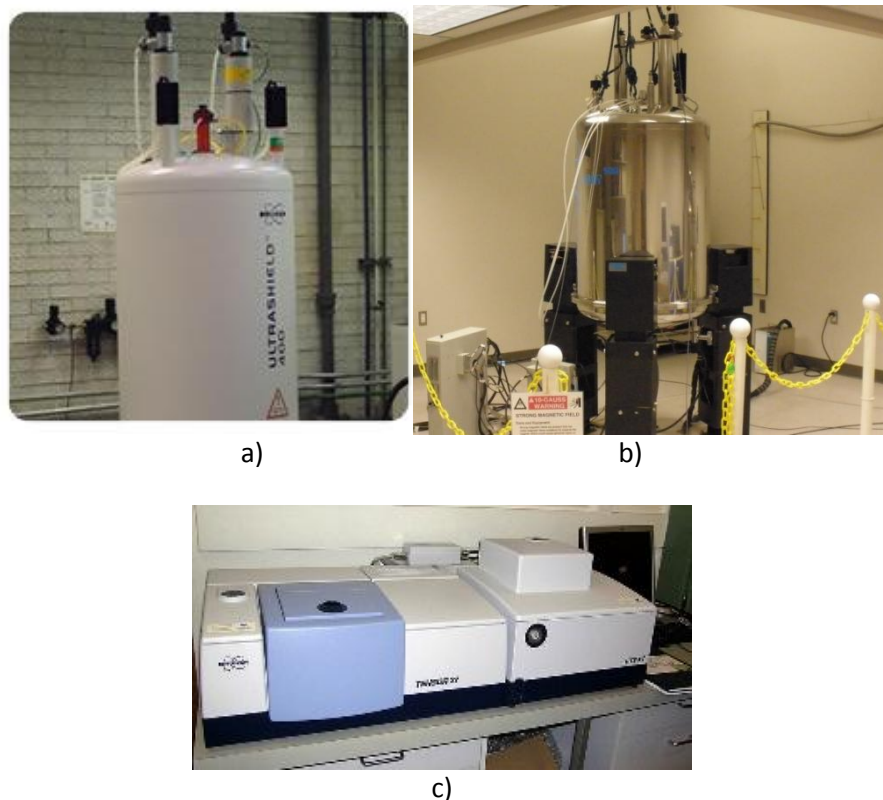


Figura 3.10. Equipos de IR y RMN. a) Bruker Tensor 27, b) Varian, unity Plus 300 Hz, c) Varian, Unity Inova 500 Hz

3.4.7.3. Software

El software utilizado para la verificación de espectros y el análisis fue el MestReNova, en donde los archivos de espectros de ^1H y ^{13}C se guardan con dominio .fid y el software utilizado para dibujar las moléculas fue el ChemBioDraw Ultra12.0 (figura 3.11.).

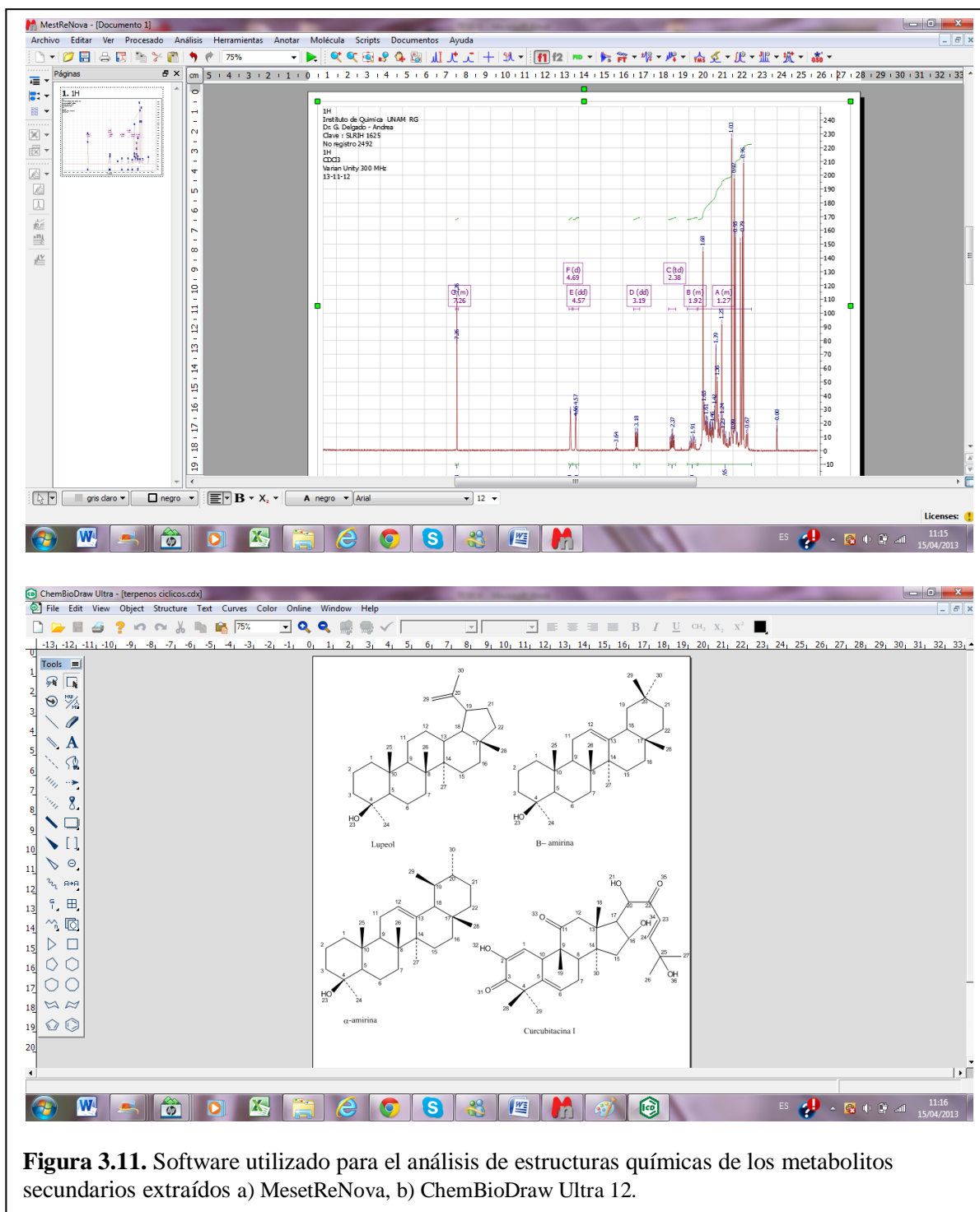


Figura 3.11. Software utilizado para el análisis de estructuras químicas de los metabolitos secundarios extraídos a) MesetReNova, b) ChemBioDraw Ultra 12.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1 rendimiento de la extracción de las hojas y tallos de *Sebastiania longicuspis*,

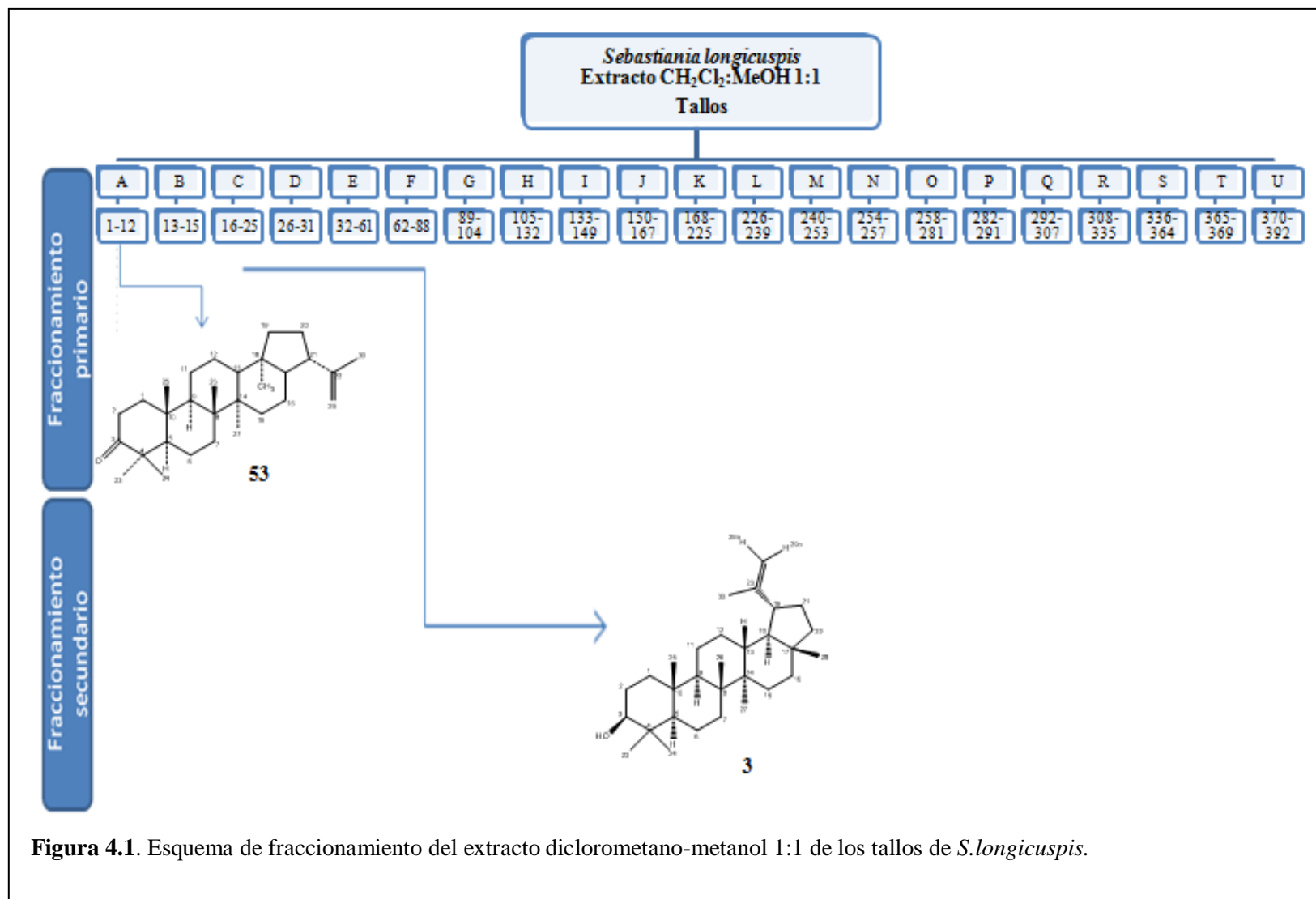
Los rendimientos se describen a continuación en la tabla 10.

Tabla 4.1. Rendimiento de la extracción de hojas y tallos

Especie	Parte	Peso en seco de las partes recolectadas (g)	Peso del extracto seco	Porcentaje del rendimiento (%)
<i>Sebastiania</i>	Hojas	1292	200	15,48
<i>longicuspis</i>	Tallos	2465	40	1,62

4.1.2. Perfil químico del extracto de diclorometano-metanol 1:1 de los tallos y hojas de *Sebastiania longicuspis*.

Las figuras siguientes muestran un resumen de los metabolitos secundarios extraídos a partir de los tallos y de las hojas de *S. longicuspis*, respectivamente.



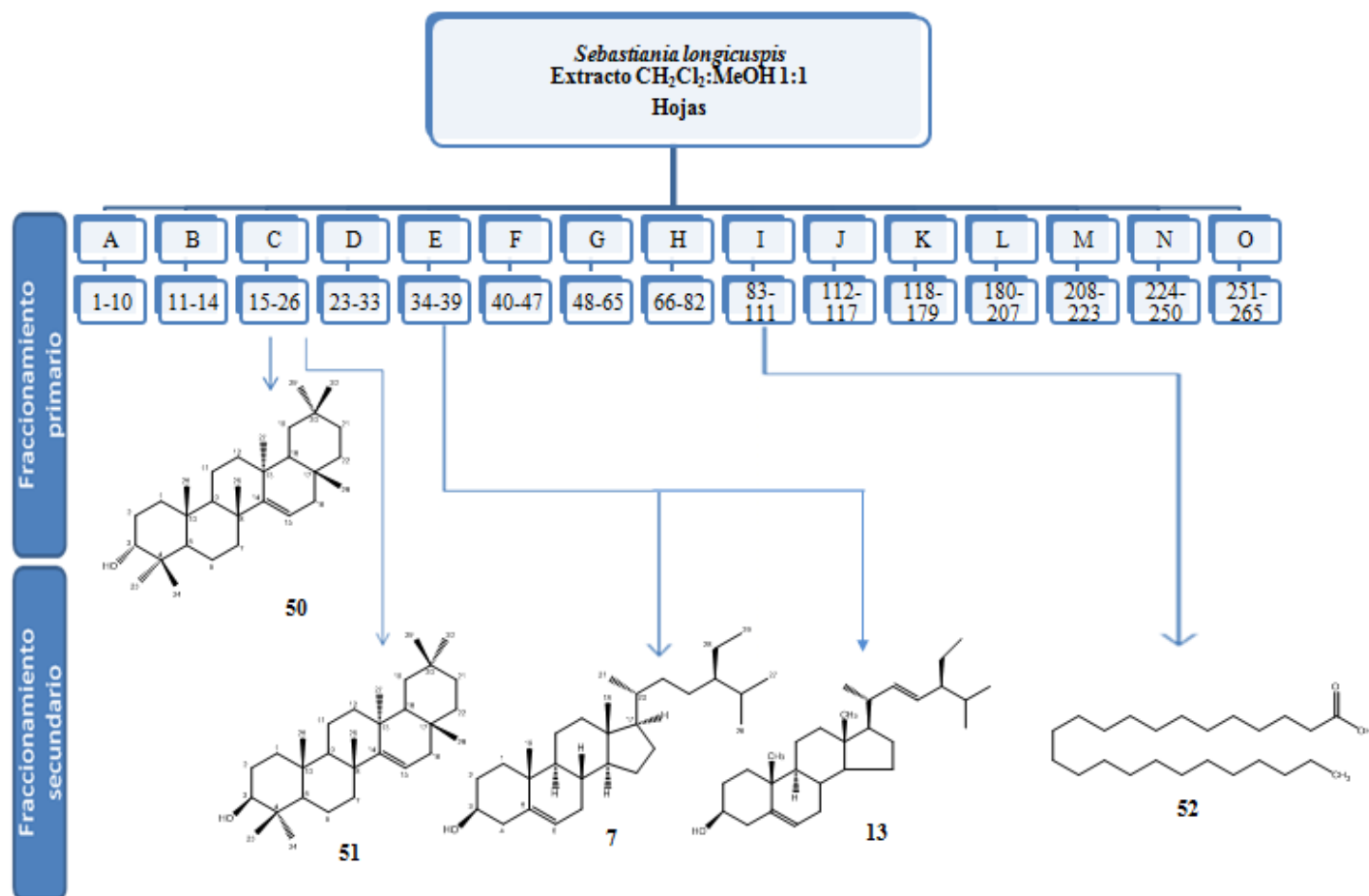


Figura 4.2. Esquema de fraccionamiento del extracto diclorometano-metanol 1:1 de las hojas de *S.longicuspis*.

4.1.2.1. Análisis de los metabolitos secundarios extraídos de los tallos de *S. longicuspis*

A continuación se analizan las estructuras químicas de los compuestos aislados en los tallos de *S. longicuspis*.

4.1.2.1.1. Análisis del compuesto 1 (Lupeol)

En el fraccionamiento secundario de la columna C, de las fracciones 22-26 y del fraccionamiento primario de la columna R de las fracciones 16-25 se aisló un sólido blanco, soluble en cloruro de metileno.

Al observar sus características físicas y cromatográficas, se observa que el punto de fusión 209°C. y su *R_f*: 0.54 (Hexano-acetato 95:5), el sólido obtenido se compara por cromatografía en capa fina con una muestra de estándar de 19 β -lupeol obtenida anteriormente en el laboratorio, las características tanto del **compuesto 3** como del estándar de 19 β -lupeol son similares; para confirmar que la muestra se trata de 19 β -lupeol se analizan las señales del espectro de RMN ^1H observadas en el espectro 1 y el espectro de RMN ^{13}C observadas en el espectro 3 en anexos.

En el espectro RMN ^1H , a campo bajo se observa la presencia de dos señales desplazadas hasta δ 4.57 y δ 4.69 que integran para un hidrógeno cada una, la una a δ 4.69 como un doblete con una $J = 2.4\text{Hz}$ y la señal de 4,57ppm es un multiplete, por lo que se establece la presencia de un grupo vinílico terminal

Por otra parte, la serie de señales a campo alto del espectro de RMN ^1H se asocian a la presencia de metilos: δ 1.03 singulete (3H, CH_3 , H-26), δ 0.94 singulete (6H, 2 CH_3 , H-23, H-27), δ 0.83 singulete (3H, CH_3 , H-25), δ 0.79 singulete (6H, 2 CH_3 , H-28. H-24).

En δ 2.38 aparece una señal como un doble de triple con $J = 6$ y 12 Hz perteneciente al hidrógeno de un metino. Las señales detalladas sugieren que se trata de una sustancia de tipo triterpénico.

El protón del carbono enlazado a un grupo carbinólico resuena en δ 3.16 como un multiplete correspondiente a un hidrógeno. Con esta información se dedujo que el compuesto correspondía al ester de un estero. Considerando, el perfil espectroscópico del grupo vinílico y el carbinol, se toma en cuenta que son característicos de triterpenos de tipo lupano. Se compararon los datos obtenidos por RMN ^1H con los informados previamente en la literatura para 19 β -lupeol (Burns, Reynolds, Buchanan, Reese, & Enriquez, 2000)

El espectro de RMN ^{13}C mostró 30 señales de carbono; la señal del carbono vinílico se presenta en 109.31 ppm, la señal correspondiente al metileno metilideno se encuentra en 150.97 ppm y el carbono enlazado al grupo hidroxilo aparece en 79.00 ppm. Al comparar los desplazamientos químicos con los

reportados en la literatura (Seger, Jandl, Brader, Robien, Hofer, & Greger, 1997), se concluyó que el compuesto es el triterpeno pentacíclico lupeol, con formula molecular C₃₀H₅₀O.

Tabla 4.2. Valores experimentales y teóricos de RMN ¹H para 3β-Lupeol.

Hidrógeno	δH ppm	
	Teóricos	Experimentales
3	3.19	3.19
9	1.27	1.25
19	2.38 b	2.38
23	0.96	0.94
24	0.76	0.76
25	0.83	0.83
26	1.03	1.03
27	0.95	0.97
28	0.78	0.79
29	4.56 a	4.57 a
	4.69 b	4.69 b

Nota: se comparan los datos de la literatura (Sousa, et al., 2012) y experimentales a 300 MHz

Tabla 4.3. Valores experimentales y teóricos de RMN ¹³C para 3β-Lupeol.

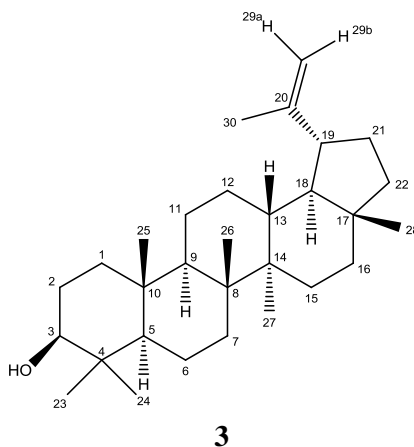
Carbono	δ ppm	
	Teóricos	Experimentales
1	38.2	38.04
2	25.3	25.13
3	79.1	79.00
4	38.9	38.70
5	55.5	55.29
6	18.5	18.31
7	34.5	34.27
8	41.0	39.99
9	50.6	50.43
10	37.3	37.16
11	21.1	20.92
12	27.5	25.73
13	39.0	38.85
14	43.0	42.82
15	27.6	27.42
16	35.8	35.57
17	43.2	42.99
18	48.5	48.17
19	49.1	48.29
20	151.1	150.97
21	30.0	29.76

Tabla 4.4. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C para 3 β -Lupeol. (*continuación*)

Carbono	δ ppm	
	Teóricos	Experimentales
22	40.2	40.82
23	28.2	27.98
24	15.6	15.36
25	16.3	16.11
26	16.2	15.97
27	14.7	14.54
28	18.2	17.99
29	109.5	109.31
30	19.5	19.30

Nota: Comparación de valores experimentales obtenidos (300 MHz) y valores teóricos (Sousa, et al., 2012) de RMN ^{13}C (300 MHz)

El espectro IR mostró una señal a 3357 cm^{-1} (estiramiento OH); 1082 cm^{-1} (C-O); 3067 cm^{-1} (H-C=), 1639 cm^{-1} (C=C); y 881 cm^{-1} (exometileno terminal) (espectro 2). Además de que se a la muestra se lo comparó directamente con un estándar puro de lupeol, y los espectros fueron idénticos, por lo que se considera su huella dactilar y se determinó que el compuesto corresponde a 19 β -lupeol .



Datos espectroscópicos:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 (TMS); ppm): 4.57 (1H, d, $J=2.24\text{ Hz}$ H-29a), 4.69 (1H, c, H-29b), 3.19 (1H, m, H-3), 2.38 (1H, td, $J=6, 11.2\text{ Hz}$, H19), 1.68 (1H, s, H-2a), 1.58 (1H, s, H-2b), 1.25 (1H, s, H-9), 1.03 (3H, s, CH_3 , H-26), 0.94 (6H, s, 2CH_3 , H-23, H-27), 0.83 (2H, s, CH_3 , H-25), 0.79 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 ; ppm): 38.04 (C-1), 25.13 (C-2), 79.00 (C-3), 38.70 (C-4), 55.29 (C-5), 18.31 (C-6), 34.27 (C-7), 39.99 (C-8), 50.43 (C-9), 37.16 (C-10), 20.92 (C-11), 25.73 (C-12), 38.85

(C-13), 42.82 (C-14), 27.42 (C-15), 35.57 (C-16), 42.99 (C-17), 48.17 (C-18), 48.29 (C-19), 150.97 (C-20), 29.76 (C-21), 40.82 (C-22), 27.98 (C-23), 15.36 (C-24), 16.11 (C-25), 15.97 (C-26), 14.54 (C-27), 17.99 (C-28), 109.31 (C-29), 19.30 (C-30).

4.1.2.1.2. Análisis del compuesto 2: (Estructura propuesta: 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene)

En el fraccionamiento primario del extracto de las ramas de la columna B, de las fracciones 4-10 se aisló un sólido blanco que formaba cristales en forma de aguja.

Al observar sus características físicas y cromatográficas, se observa que el punto de fusión es de 218°C. y su *R_f*: 0.64 (Hexano-acetato 98:2), el sólido obtenido se compara por cromatografía en capa fina con esteroides obtenidos anteriormente en el laboratorio, por lo que se descarta que se trate de un esteroide. Se procede al análisis de los espectros de RMN ¹H observados en el espectro 5 y el espectro 6 de RMN ¹³C observados en el espectro 7

En el espectro RMN ¹H, a campo bajo se observa la presencia de dos señales desplazadas hasta δ 4.68 y δ 4.70 que integran para un hidrógeno cada una, la una a δ 4.68 se observa como multiplete, y la señal de 4,70 ppm es un doble de cuartetos, con *J*= 1,38 Hz, 1,38 Hz, 1,38 Hz y 2,78 Hz, por lo que se establece la presencia de un grupo vinílico terminal (H29a-H29b), las *J* parecidas indican que posiblemente la señal deba integrarse solo para un doblete, pero tal vez la presencia de impurezas, hace que la *J* de dos de los picos del doble de cuartetos se salga del rango.

Por otra parte, las señales a campo alto del espectro de RMN ¹H se asocian a la presencia de metilos: δ 1.08 singlete, δ 0.95 doblete, *J*=0,70 Hz, ; estas señales se designan a dos metilos terminales, de las posiciones: H23 y H24; δ 1,03 doblete, *J*=0,70 Hz, que integra para 6 H (en esta señal se deduce que son dos metilos sobrepuestos debido a su integral de 6H), se les designa a los H25 y H26; δ 0.94 doblete, *J*=0,76 Hz, (3H, H-27); δ 1.68 doble de dobles, *J*=0 Hz, que integra para tres hidrógenos, debido a la influencia del doble enlace se observa su desplazamiento a campo un poco más bajo, por lo que se le asigna la posición H-30. Se verifica en la bibliografía los datos espectroscópicos, y se comparan. (Sousa, Duarte, Alcantara, & Silva, 2012)

El espectro de RMN ¹³C mostró 30 señales de carbono; la señal del carbono vinílico se presenta en 109.49 ppm, la señal correspondiente al carbono cuaternario se encuentra en 148.11 ppm y el carbono enlazado al oxígeno aparece en 218.08 ppm. Al comparar los desplazamientos químicos con los reportados en la literatura (Sousa, Duarte, Alcantara, & Silva, 2012), se concluyó que el compuesto es

un triterpeno pentacíclico, con formula molecular C₃₀H₅₀O. y mediante el SciFinder, una página científica de internet, nos permitió asegurarnos de que la estructura no había sido reportada anteriormente con ningún nombre, por lo que le asignamos el nombre químico de 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene (**53**) debido a sus saturaciones de los enlaces dentro del anillo del tipo hopano.

Tabla 4.5. Comparación de valores experimentales obtenidos (400 MHz) y valores teóricos [8] de RMN ¹H (300 MHz) para 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene .

Posición	d _H (multiplicidad, JHz)	
	Teórico	Experimental
22	2,41 (1H, m)	2,45 (1H, m)
20	0,67 (3H, s)	0,69 (3H, d, J=1,06 Hz)
23	1,05 (3H, s)	1,08 (3H, s)
24	0,93 (3H, s)	0,95 (3H, d, J=0,70 Hz)
25- 26	1,01 (6H,s)	1,03 (6H,d, J=1,96)
27	0,91 (3H,s)	0,94 (3H, d, J=0,76)
29a	4,67 (1H,d, J=1,1)	4,70 (1H, dq, J=1.38, 1.38, 1.38, 2.78)
29b	4,65 (1H, dd, J=1,1)	4,68 (1H, m)
30	1,65 (3H,s)	1,68 (3H, dd, J=0)

Nota: Comparación de valores experimentales obtenidos (400 MHz) y valores teóricos (Sousa, et al. 2012) de RMN ¹H (300 MHz) para 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene .

Tabla 4.6. Valores experimentales y teóricos de RMN ¹³C para 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene.

Posición	δ_c	
	Teórico	Experimental
1	39,6	39,60
2	34,2	34,20
3	217,9	218,08
4	47,4	47,37
5	54,9	54,88
6	19,8	19,78
7	32,7	32,68
8	41,6	41,68
9	49,7	49,74
10	36,8	36,86
11	21,6	21,60
12	23,9	23,94
13	48,8	48,83
14	42,3	42,34
15	32,7	32,68
16	20,8	20,85
17	53,9	53,88

Tabla 4.7. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C para 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene.
(continuación)

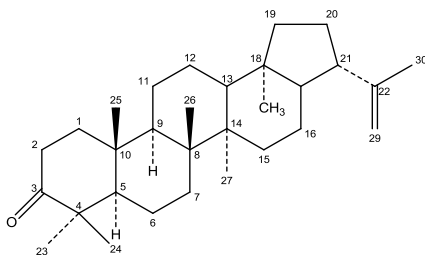
Posición	δ_{C}	
	Teórico	Experimental
18	44,2	44,21
19	40,2	40,20
20	27,8	27,36
21	47,9	47,87
22	148,0	148,11
23	26,6	26,59
24	21,1	21,12
25	15,7	15,77
26	16,5	16,51
27	16,5	16,51
28	15,2	15,18
29	109,5	109,49
30	19,7	19,68

Nota: Comparación de valores experimentales obtenidos (400 MHz) y valores teóricos (300 Hz) (Sousa, et al., 2012) de RMN ^{13}C (300 MHz)

Datos espectroscópicos:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 (TMS); ppm): 4,70 (1H, dq, $J=1.38, 1.38, 1.38, 2.78$; H-29a), 4,68 (1H, m, H-28b), 2,45 (1H, m, H-22), 1,68 (3H, dd, $J=0$ Hz, H-30), 1,08 (3H, s H-23), 1,03 (6H, d, $J=1.96$ Hz, H-25, H26), 0,95 (3H, d, $J=0.70$ Hz, H-24), 0,94 (3H, d, $J=0.76$ Hz, H-27), 0,69 (3H, d, $J=1.06$ Hz, H-20).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 ; ppm): 39.60 (C-1), 32.20 (C-2), 218.08 (C-3), 47.37 (C-4), 54.88 (C-5), 19.78 (C-6), 32.68 (C-7), 41.68 (C-8), 49.74 (C-9), 36.86 (C-10), 21.60 (C-11), 23.94 (C-12), 48.83 (C-13), 42.34 (C-14), 32.68 (C-15), 20.85 (C-16), 53.88 (C-17), 44.21 (C-18), 40.20 (C-19), 27.36 (C-20), 47.87 (C-21), 148.11 (C-22), 26.59 (C-23), 21.12 (C-24), 15.77 (C-25), 16.51 (C-26), 16.51 (C-27), 15.18 (C-28), 109.49 (C-29), 19.68 (C-30).



4.1.2.2. Análisis de los metabolitos secundarios extraídos de las hojas de *S. longicuspis*

A continuación se analizan las estructuras químicas de los compuestos aislados de las hojas de *S. longicuspis*.

4.1.2.2.1. Análisis del compuesto 3 (Epi-taraxerol)

En la fracción 18 del fraccionamiento Primario de las hojas, se aisló un sólido blanco cristalino, el cual se lavó con hexano.

Se observan sus características físicas y cromatográficas:

Punto de fusión: 268-270 °C.

R_f: 0,69; hexano-AcOEt 9:1

Se analizan las señales del espectro de RMN ^1H y el espectro de RMN ^{13}C .

La resonancia de protones metílicos aparecen como siete singuletes (figura 4.3) a δ 1,09 (3H), δ 0,98 (3H), δ 0,95 (3H), δ 0,93 (3H), δ 0,91 (3H), δ 0,91 (3H), δ 0,82 (3H), δ 0,80 (3H), correspondiente a las señales de RMN ^{13}C en δ 25,9 (C-26), δ 27,98 (C-23), δ 33,34 (C-29), δ 15,42 (C-25), δ 29,81 (C-27), δ 21,3 (C-30), δ 29,91 (C-28), δ 15,42 (C-24), respectivamente.

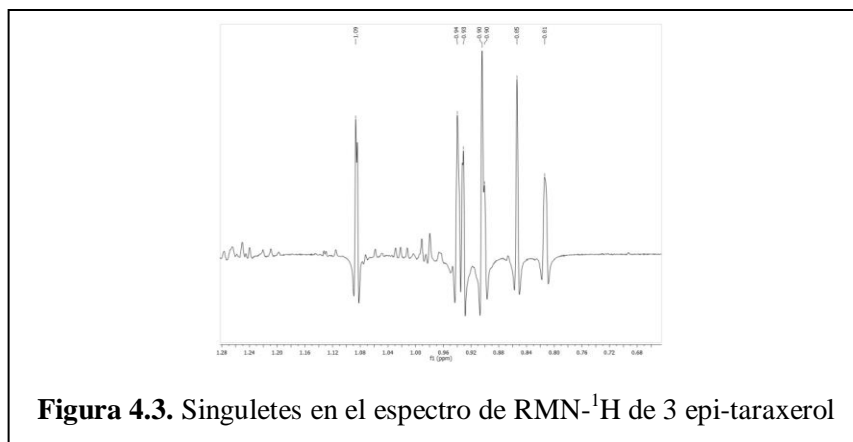
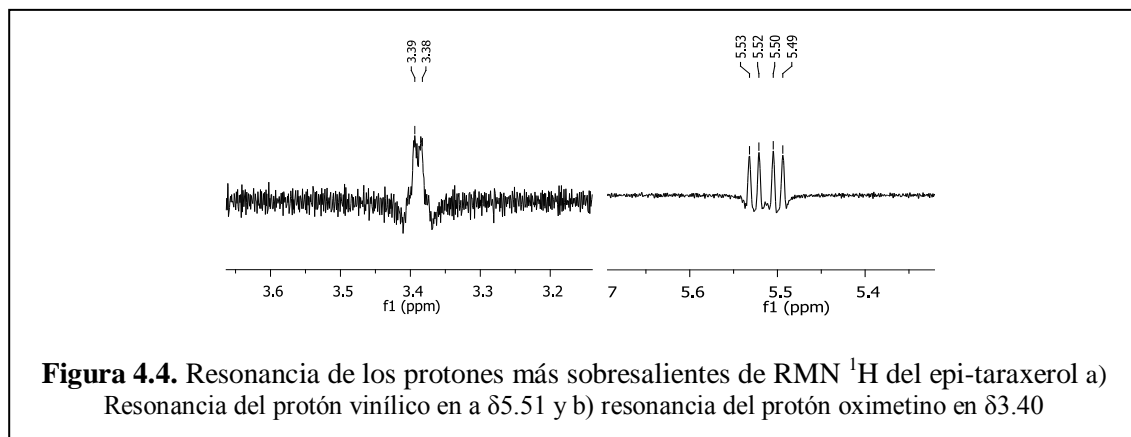


Figura 4.3. Singuletes en el espectro de RMN- ^1H de 3 epi-taraxerol

La resonancia para el protón vinílico (H-15) indica un doble de dobles a δ 5,51 ($J=3.39$ y 8.18). La señal a δ 3.40 es un triplete (1H, $J=3.05$ Hz) se asignó al protón del oximetino (H-3), las constantes de acoplamiento de 3.05 Hz implican que el H-3 se encuentra en posición- β ecuatorial.



Adicional, los espectros de RMN ^{13}C , DEPT 90 y DEPT 135° indican que el compuesto tiene 10 metilenos en su estructura ($\delta 41.20$, $\delta 37.68$, $\delta 36.64$, $\delta 35.08$, $\delta 33.72$, $\delta 33.07$, $\delta 31.21$, $\delta 25.03$, $\delta 18.72$, $\delta 17.42$), cinco carbonos metinos ($\delta 116.74$, $\delta 76.24$, $\delta 49.25$, $\delta 48.93$, $\delta 48.71$) y siete carbonos cuaternarios ($\delta 158.16$, $\delta 39.16$, $\delta 38.04$, $\delta 37.52$, $\delta 37.37$, $\delta 35.11$, $\delta 28.81$), y ocho metilos ($\delta 33.35$, $\delta 29.94$, $\delta 29.82$, $\delta 28.21$, $\delta 26.07$, $\delta 22.19$, $\delta 21.25$, $\delta 15.24$)

Mediante este análisis se comprueba que la fórmula molecular del compuesto es $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}$, y su estructura corresponde al 27-norolean-14-en- 3α ol, el cual es el mismo compuesto reportado con el nombre de 3epi-Taraxerol (**50**). Los valores experimentales se compararon con valores teóricos de la literatura (Zhen, Wei, & Zhi-Wei., 2010).

Tabla 4.8. Valores experimentales y de RMN ^1H de 3-epi-taraxerol.

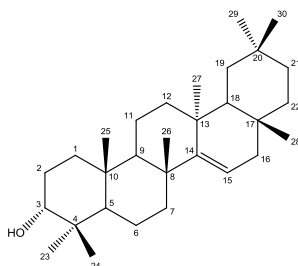
Posición	D_H (multiplicidad, JHz)	
	Literatura	Experimental
3	3,40 (1H,t, 2.6 Hz)	3,39 (1H, t, 3.05 Hz)
15	5,52 (1H, dd, 8.1, 3.1)	5,52 (1H, dd, 8.18, 3.39)
23	0,85 (3H,s)	0,86 (6H,s)
24	0,94 (3H,s)	0,936 (3H,s)
25	0,95 (3H,s)	0,95 (6H,s, H-25, H29)
26	1,09 (3H,s)	1,09 (3H,s)
27	0,91 (3H,s)	0,91 (6H,s, H27, H30)
28	0,82 (3H,s)	0,82 (3H,s)
29	0,95 (3H,s)	0,95 (6H,s, H-25, H29)
30	0,91 (3H,s)	0,91 (6H,s, H27, H30)

Nota: Datos experimentales obtenidos (300 MHz) y valores teóricos (Zhen, Wei, & Zhi-Wei., 2010) de RMN ^1H (300 MHz) para 3epi-Taraxerol.

Tabla 4.9. Valores experimentales y teóricos de 3epi-taraxerol de ^{13}C

Posición	Tipo de Carbono	δC	
		Literatura	Experimental
1	CH2	32,3	32,24
2	CH2	25,1	25,06
3	CH	76,2	76,24
4	C	37,4	37,71
5	CH	49	49,25
6	CH2	18,8	18,75
7	CH2	41,3	41,23
8	C	39,2	39,16
9	CH	49,3	49,25
10	C	38,1	38,04
11	CH2	17,4	17,45
12	CH2	33,8	33,75
13	C	37,5	37,52
14	C	158,2	158,16
15	CH	116,8	116,74
16	CH2	37,3	37,71
17	C	35,8	35,11
18	CH	48,8	48,93
19	CH2	36,7	36,67
20	C	28,8	28,82
21	CH2	33,1	33,1
22	CH2	35,1	35,11
23	CH3	28,2	28,21
24	CH3	22,2	22,19
25	CH3	15,2	15,24
26	CH3	26,1	26,07
27	CH3	21,3	21,25
28	CH3	29,8	29,82
29	CH3	33,3	33,35
30	CH3	29,9	29,94

Nota: Datos experimentales obtenidos (300 MHz) y valores teóricos (Zhen, Wei, & Zhi-Wei., 2010) de RMN ^{13}C (300 MHz) para 3epi-taraxerol.



50

Datos espectroscópicos:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 (TMS); ppm): 5,52 (1H, dd, $J=3.05$ Hz, H-15), 3,39 (1H, t, $J=3.05$ Hz, H-3), 1,09 (3H,s, H-26), 0,86 (3H,s, H-23), 0,95 (6H,s, H-25,29), 0,91 (6H,s, H-27,30), 0,82 (3H,s, H-28), 0,94 (3H,s, H-24).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 ; ppm): 32.24 (C-1), 25.06 (C-2), 76.24 (C-3), 37.71 (C-4), 49.25 (C-5), 18.75 (C-6), 41.23 (C-7), 39.16 (C-8), 49.25 (C-9), 38.04 (C-10), 17.45 (C-11), 33.75 (C-12), 37.52 (C-13), 158.16 (C-14), 116.74 (C-15), 37.71 (C-16), 35.11 (C-17), 48.93 (C-18), 36.67 (C-19), 28.82 (C-20), 33.10 (C-21), 35.11 (C-22), 28.21 (C-23), 22.19 (C-24), 15.24 (C-25), 26.07 (C-26), 21.25 (C-27), 29.82 (C-28), 33.35 (C-29), 29.94 (C-30).

4.1.2.2.2 Análisis Compuesto 4 (Taraxerol)

En el fraccionamiento secundario de la columna C, de las fracciones 37-53 se aisló un sólido blanco. Se observan sus características físicas y cromatográficas, el sólido obtenido corre en CCF a un R_f : 0.52 (Hexano-Acetato 94:6), el cual es menor al lupeol y con punto de fusión fue de 273-275 °C.

Se analizan las señales del espectro de RMN ^1H y el espectro de RMN ^{13}C .

La resonancia de protones metílicos aparecen como siete singuletes a δ 1,09 (3H), δ 0,98 (3H), δ 0,95 (3H), δ 0,93 (3H), δ 0,91 (3H), δ 0,91 (3H), δ 0,82 (3H), δ 0,80 (3H), correspondiente a las señales de RMN ^{13}C en δ 25,9 (C-26), δ 27,98 (C-23), δ 33,34 (C-29), δ 15,42 (C-25), δ 29,81 (C-27), δ 21,3 (C-30), δ 29,91 (C-28), δ 15,42 (C-24), respectivamente

La resonancia para el protón vinílico (H-15) indica un doble de dobles a δ 5.53 ($J=8.2, 3.2$ Hz. El doble de dobles a δ 3.20 se asignó al protón del oximetino (H3), las constantes de acoplamiento de 10.7 y 4.9 Hz implican que el H-3 se encuentra en posición- α axial.

Adicional, los espectros de RMN ^{13}C , DEPT 90° Y DEPT 135° indican que el compuesto tiene 10 metilenos en su estructura (δ 41.31, δ 37.71, δ 36.66, δ 35.10, δ 33.68, δ 33.08, δ 29.69, δ 27.12, δ 18.78, δ 17.49), cinco carbonos metinos (δ 116.87, δ 79.08, δ 55.51, δ 49.27, δ 48.73) y siete carbonos cuaternarios (δ 158.08, δ 38.95, δ 38.75, δ 37.98, δ 37.55, δ 36.78, δ 28.79). Mediante este análisis se sugiere que la fórmula molecular del compuesto es $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}$, y su estructura corresponde al 27-norolean-14-en-3 β ol, el cual es el mismo compuesto reportado con el nombre de 3 β -Taraxerol (**51**).

Tabla 4.10. Valores experimentales y valores teóricos de RMN ^1H para 3 β -taraxerol.

Posición	d_H (multiplicidad, JHz)	
	Literatura	Experimental
3	3,20 (1H, dd, 11.5, 5.0 Hz)	3,20 (1H, dd, 10.7, 4.9 Hz)
12	1,90 (2H, m)	1,92 (2H, dd, 14.7, 2.9 Hz)
15	5,53 (1H, dd, 8.5, 3.5)	5,53 (1H, dd, 8.2, 3.2)
19	2,02 (1H, dt, 3.0, 13.0)	2,03 (1H, dt, 6.20, 2.8 Hz)
23	0,97 (3H,s)	0,98 (3H,s)
24	0,80 (3H,s)	0,80 (3H,s)
25	0,92 (3H,s)	0,93 (3H,s)
26	1,09 (3H,s)	1,09 (3H,s)
27	0,90 (3H,s)	0,91 (3H,s)
28	0,82 (3H,s)	0,82 (3H,s)
29	0,94 (3H,s)	0,95 (3H,s)
g30	0,90 (3H,s)	0,91 (3H,s)

Nota: Datos experimentales obtenidos (300 MHz) y valores teóricos (Zhen, Wei, & Zhi-Wei., 2010) de RMN ^{13}C (300 MHz) para 3 β -taraxerol

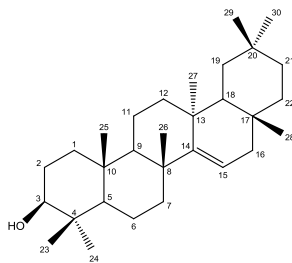
Tabla 4.11. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C (300 MHz) para 3 β -taraxerol.

Posición	Tipo de Carbono	δC	
		Literatura	Experimental
1	CH ₂	37,68	36,66
2	CH ₂	27,11	27,12
3	CH	79,05	79,08
4	C	37,96	37,98

Tabla 4.12. Valores experimentales y teóricos de RMN ^{13}C (300 MHz) para 3 β -taraxerol.
(continuación)

Posición	Tipo de Carbono	δC	
		Literatura	Experimental
5	CH	55,45	55,51
6	CH ₂	18,77	18,78
7	CH ₂	33,64	29,69
8	C	38,95	38,95
9	CH	49,24	49,27
10	C	37,53	37,55
11	CH ₂	17,48	17,49
12	CH ₂	37,7	37,71
13	C	35,77	36,77
14	C	158,05	158,08
15	CH	116,86	116,87
16	CH ₂	35,08	35,10
17	C	38,74	38,75
18	CH	48,7	48,73
19	CH ₂	41,28	41,31
20	C	28,78	28,79
21	CH ₂	33,66	33,34
22	CH ₂	33,06	33,08
23	CH ₃	27,97	27,98
24	CH ₃	15,41	15,42
25	CH ₃	15,44	15,42
26	CH ₃	25,89	25,9
27	CH ₃	29,8	29,81
28	CH ₃	29,9	29,91
29	CH ₃	33,33	33,34
30	CH ₃	21,29	21,3

Nota: Datos experimentales obtenidos (300 MHz) y valores teóricos de RMN ^{13}C (300 MHz) para 3 β -taraxerol.



44

Datos espectroscópicos:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 (TMS); ppm): 5,53 (1H, dd, $J=8.2, 3.2$ Hz, H-15), 3.20 (1H, dd, $J=10.7, 4.9$ Hz, H-3), 2,03 (1H, dt, $J=6.20, 2.8$ Hz, H-19), 1,92 (2H, dd, 14.7, 2.9 Hz, H-12), 1,09 (3H,s, H-26), 0,98 (3H,s, H-23), 0,95 (3H,s, H-29), 0,93 (3H,s, H-25), 0,91 (3H,s, H-30), 0,91 (3H,s, H-27), 0,82 (3H,s, H-28), 0,80 (3H,s, H-24).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 ; ppm): 36.66 (C-1), 27.12 (C-2), 79.08 (C-3), 37.98 (C-4), 55.51 (C-5), 18.78 (C-6), 29.69 (C-7), 38.95 (C-8), 49.27 (C-9), 37.55 (C-10), 17.49 (C-11), 37.71 (C-12), 36.77 (C-13), 158.08 (C-14), 35.10 (C-15), 35.10 (C-16), 38.75 (C-17), 48.73 (C-18), 41.31 (C-19), 28.79 (C-20), 33.34 (C-21), 33.08 (C-22), 27.98 (C-23), 15.42 (C-24), 15.42 (C-25), 25.90 (C-26), 29.81 (C-27), 29.91 (C-28), 33.34 (C-29), 21.30 (C-30).

4.1.2.2.3. Análisis del compuesto 5 (mezcla de β -sitosterol y estigmasterol)

En el fraccionamiento secundario de las columnas DE, de las fracciones 31- se aisló un sólido blanco cristalino, el cual fue lavado con hexano y se realizó una recrystalización en una mezcla de hexano-acetato.

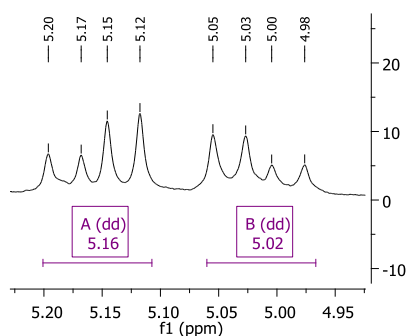
Al observar sus características físicas y cromatográficas, se observa que el punto de fusión es de 138°C - 141°C . y su R_f : 0.54, hexano-AcOeT 85:15.

El sólido obtenido se compara por cromatografía en capa fina con una muestra de estándares de esteroides como: estigmasterol, β -sitosterol, espinasterol, estándares obtenidos anteriormente en el laboratorio, las características tanto del compuesto 5 como de los estándares estigmasterol y β -sitosterol son similares, para confirmar la estructura del compuesto, se analizan las señales del espectro de RMN ^1H observadas en el espectro 19 y el espectro de RMN ^{13}C observadas en el espectro 20.

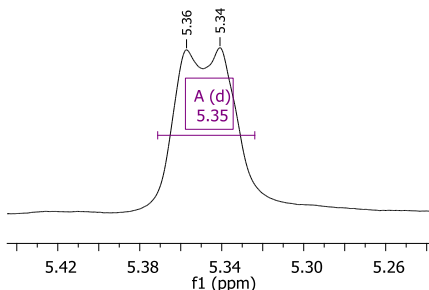
En el espectro RMN ^1H se observa un perfil característico para compuestos esteroidales, con señales intensas a campo alto. La serie de señales desplazadas en este campo del espectro de RMN ^1H se asocian a la presencia de seis metilos: δ 1.01 singulete (3H, CH₃, H-19), δ 0.92 doblete (3H, CH₃, J=6.4 Hz, H-21), dos señales a δ 0.86 doblete, pero que integra con J=0 Hz para dos hidrógenos se deduce que se trata de dos singuletes superpuestos (6H, 2CH₃, H-26 y H-27), δ 0.82 triplete (3H, H-29) y δ 0.68 singulete (3H, H-18)

El protón del carbono enlazado a un grupo carbinólico resuena en δ 3.52 (1H, ddd, J=15.4, 10.5, 4.8 Hz) que corresponde al protón de un carbono enlazado al grupo hidroxilo, esta es una señal característica para el hidrógeno ubicado en posición 3 del anillo esteroidal, que de acuerdo a las constantes de acoplamiento permite ubicar el grupo hidroxilo en posición β .

Las señales en δ 5.02 (1H, dd, J=15.2, 8.4 Hz) y δ 5.16 (1H, dd, J=15.2, 8.5 Hz) son características para los protones vinílicos sobre C-22 y C-23 del estigmasterol.



Otra señal característica para los esteroides es la observada en el espectro en δ 5.35 (1H, d, J=4.9 Hz) correspondiente al protón oleofínico en posición 6 del núcleo esteroidal.



Con esta información se dedujo que el compuesto correspondía a un esteroide. Considerando, el perfil espectroscópico del grupo vinílico y el carbinol, se toma en cuenta que son característicos de

triterpenos de tipo lupano. Se compararon los datos obtenidos por RMN ^1H con los informados previamente en la literatura para β -sitosterol y estigmasterol. (Prieto, Patiño, Lesmes, Lozano, & Cuca, 2011)

El espectro de RMN ^{13}C mostró 29 señales de carbono; las señales ubicadas a 140.76 y 121.69 ppm corresponden al doble enlace endocíclico (C5-C6); en la zona propia de desplazamiento de carbonos enlazados a grupos hidroxílicos resuena una señal a 71.79 ppm (C3). Al comparar los desplazamientos químicos con los reportados en la literatura (Rowshanul, Nikkon, & Rahman, 2007), se sugiere que el compuesto es un esteroide, con fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$.

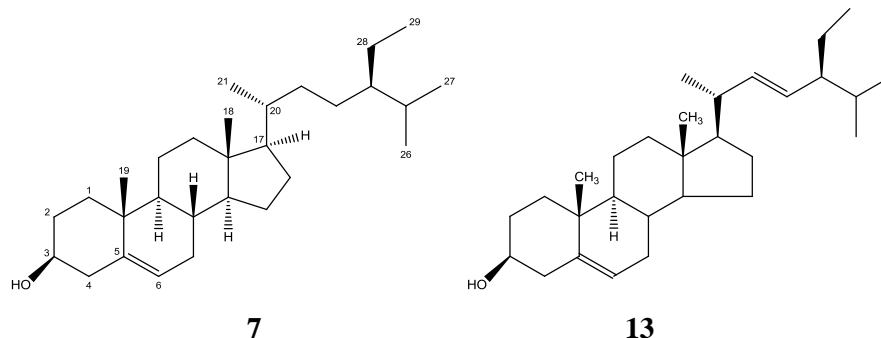
Se observaron que los datos espectrales experimentales coinciden con los datos espectrales de la literatura para el β -sitosterol y para el estigmasterol, por lo que se revisó estudios anteriores sobre esteroides extraídos de plantas y se observó que el β -sitosterol y el estigmasterol son isómeros que comúnmente se encuentran en mezcla en la naturaleza y son muy difíciles de separar.

Para corroborar esta información se procedió a realizar un estudio bidimensional COSY, con lo que confirmamos que efectivamente se trata de la mezcla de los esteroides β -sitosterol (7) y estigmasterol (13).

Tabla 4.13. Valores experimentales y teóricos de RMN ^1H para β -Sitosterol-estigmasterol.

Protones en átomo de Carbono	Señal / Integral		δ_{H} [ppm]	
			Literatura	Experimental
3	m	1H	3.50	3.52
6	d	1H	5.38	5.35
18	s	3H	0.70	0.68
19	s	3H	1.00	1.01
21	d	3H	0.95	0.92
26	d	3H	0.78	0.86
27	d	3H	0.75	0.86
29	t	3H	0.90	0.82

Nota: Comparación de valores experimentales obtenidos (300 MHz) y valores teóricos (Rowshanul, et al., 2007) de RMN ^1H (300 MHz) para β -Sitosterol-estigmasterol.



Datos espectroscópicos:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 (TMS); ppm): 5,35 (1H, d, $J=5.2$, H-6), 3,52 (1H, m, H-3), 1,01 (3H, s, H-19), 0,92 (3H, d, $J=6,4$ Hz, H-21), 0,86 (5H, d, $J=0$ Hz, H-26 y H-27), 0,82 (3H, t, H-29), 0,68 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 ; ppm): 37.26 (C-1), 31.66 (C-2), 71.79 (C-3), 42.31 (C-4), 140.76 (C-5), 121.69 (C-6), 33.95 (C-7), 31.90 (C-8), 50.14 (C-9), 36.50 (C-10), 21.08 (C-11), 39.78 (C-12), 40.47 (C-13), 56.77 (C-14), 24.30 (C-15), 28.23 (C-16), 56.06 (C-17), 11.85 (C-18), 19.32 (C-19), 36.14 (C-20), 18.77 (C-21), 33.95 (C-22), 26.10 (C-23), 45.84 (C-24), 29.17 (C-25), 19.32 (C-26), 19.03 (C-27), 23.07 (C-28), 11.97 (C-29).

4.1.2.2.3. Análisis del compuesto 6: (ácido lignocérico)

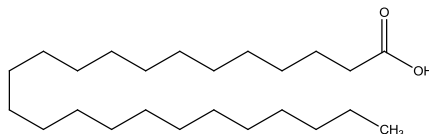
En el fraccionamiento secundario de la columna C, de las fracciones 31- 57 se aisló un sólido blanco cristalino, de aspecto graso que fundía entre los dedos, el cual era muy soluble en hexano caliente.

Al observar sus características físicas y cromatográficas, se observa que el punto de fusión es de 54°C . y su *R_f*: 70, hexano-AcOeT 85:15., y su mancha es característica de los ácidos grasos (aspecto graso, arrastrada con cola, no revela con luz U.V., pero sí con sulfato cérico de amonio)

El sólido obtenido se compara por cromatografía en capa fina con una muestra de estándares de esteroides como: estigmasterol, β -sitosterol, espinasterol, estándares obtenidos anteriormente en el laboratorio, pero no corresponde a ninguna de las características de estos compuestos, la mancha en la cromatoplaque es característica de las grasas, para confirmar la estructura del compuesto, se analizan las señales del espectro de RMN ^1H observadas en el espectro 24.

El espectro de RMN ^1H muestra cuatro grupo de señales: a $\delta 2.35$ se observa un triplete, que integra para dos hidrógenos, este desplazamiento es típico de los protones unidos a ácidos carboxílicos, a $\delta 0.88$ se observa una señal como un triplete, que integra para tres hidrógenos; típica de los protones de metilo, a $\delta 1.25$ se observa la presencia de un gran singulete que integra para 20 protones, por lo que se deduce que esta señal corresponde a una cadena de CH_2 , lineales, por la integración de los veinte protones se deduce un total de 10 grupo metileno y finalmente una señal a $\delta 1.63$ que se muestra como un multiplete que integra para dos hidrógenos, típica de los desplazamientos de los metilenos.

Con estos datos espectroscópicos es suficiente para deducir que la estructura del compuesto de análisis corresponde a la fórmula molecular: $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$, que revisando en la bibliografía corresponde al nombre de ácido lignocérico (**52**).



52

Tabla 4.14. Datos Experimentales RMN ^1H para ácido lignocérico.

Protones en átomo de Carbono	Señal / Integral	δ_{H} [ppm] Experimental
2	T 2H	2.35
3	M 2H	1.63
4-23	S 20H	1.25
24	T 3H	0.88

Nota: los datos se determinaron a 300 MHz

Datos espectroscópicos:

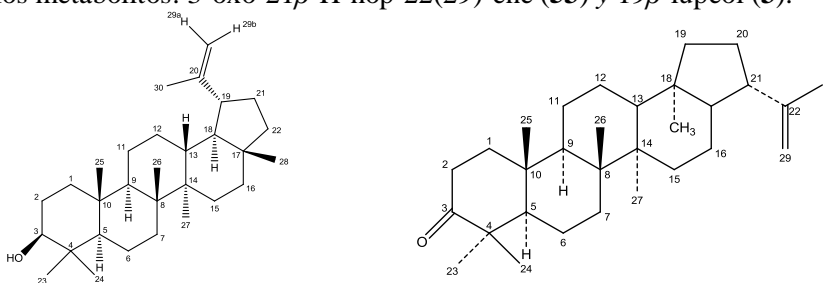
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 (TMS); ppm): 2,35 (2H, t, H-2), 1.63 (2H, m, H-3), 1,25 (20H, s, H-4-H23), 0,88 (3H, t, H-24).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

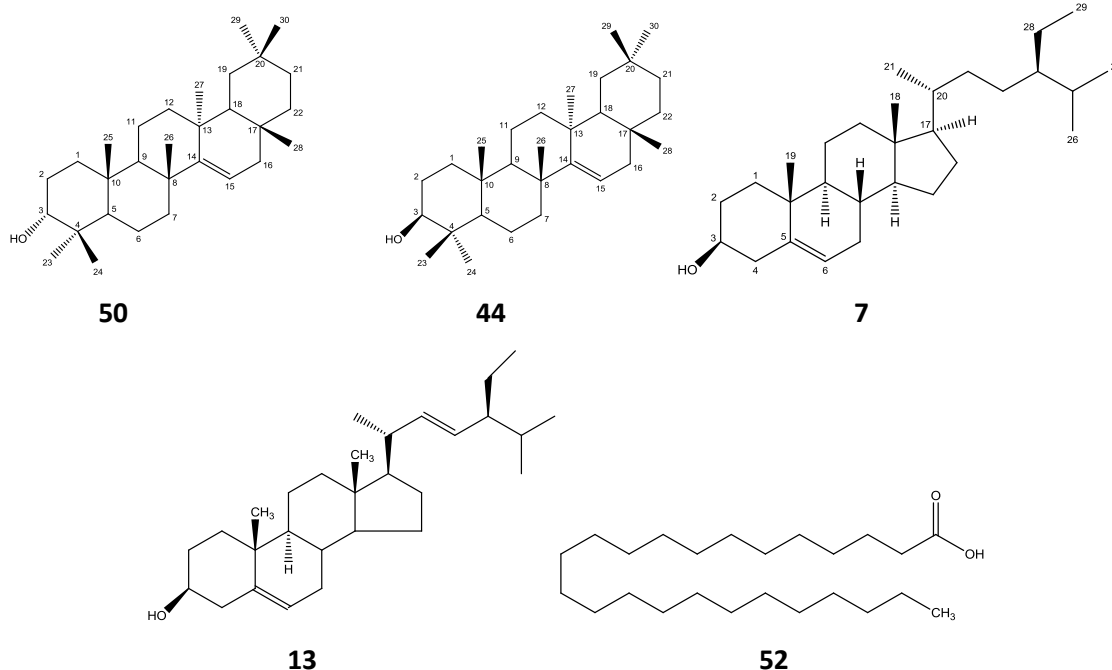
5.1. Conclusiones

- El rendimiento de la extracción de los sólidos solubles en diclorometano-metanol 1:1 fue de 15,48% para las hojas y 1,62% para los tallos,
- A partir del extracto diclorometano-metanol (1:1) de los tallos de *S. longicuspis*. Se aislaron y caracterizaron los metabolitos: 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene (**53**) y 19 β -lupeol (**3**).



3. 53

- Mediante el análisis del extracto diclorometano:metanol (1:1) de las hojas de *S. longicuspis* se aislaron y caracterizaron los metabolitos siguientes: *epi*-taraxerol (**50**), taraxerol (**44**), 19 β -lupeol (**3**), mezcla de β -sitosterol (**7**) y estigmasterol (**13**), y ácido lignocérico (**52**)



- De acuerdo a los resultados se puede concluir que el extracto diclorometano-metanol 1:1 de esta especie vegetal está constituido principalmente por terpenos, derivados de terpenos, fitoesteroles y grasas vegetales. Se ha informado que tanto los terpenos y los esteroides son compuestos bioactivos y por esta razón serían los responsables de propiedades medicinales atribuidas a esta planta; además las grasas vegetales podrían ser coadyuvantes para la posible actividad biológica.
- Los metabolitos secundarios identificados tanto en las hojas como en los tallos: 19 β -lupeol, mezcla de β -sitosterol y estigmasterol, taraxerol y 3-epi taraxerol han sido aislados con anterioridad en otras especies de este mismo género, pero el compuesto 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene, no ha sido reportado en este género, por lo que la estructura de este metabolito secundario es un nuevo compuesto a reportarse en el género *Sebastiania*.
- La especie *S. longicuspis* no ha sido estudiada anteriormente, por lo que se reconoce su importancia en la investigación química para el desarrollo de nuevos fármacos

5.2. Recomendaciones

- Continuar con la investigación en el aislamiento y determinación de metabolitos secundarios presentes en las fracciones secundarias más polares del extracto de diclorometano/metanol 1:1 de las hojas y tallos de *S. longicuspis*.
- Los procesos de purificación de los metabolitos secundarios extraídos de plantas debe realizarse muy cuidadosamente debido a que las cantidades de estos compuestos pueden ser muy pequeñas.
- Investigar posibles actividades farmacológicas y ensayos de toxicidad que podrían presentar los metabolitos secundarios aislados de *S. longicuspis*, especialmente del metabolito 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene, del cual su información es muy escasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, O., & Cuéllar, A. (24 de Julio de 2008). *Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar*. Recuperado el 28 de Enero de 2013, de http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13_3_08/pla09308.htm
- Albán, M., & Ramos, P. (Enero de 2011). *Cromatografía*. Recuperado el 10 de Marzo de 2013, de http://ocw.uv.es/ocw-formacio-permanent/2011-1-35_Manual.pdf
- Atkins, P. (2006). *Principios de química* (3a ed.). Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
- Bahamonde, R. (2008). *Estudio fitoquímico de la corteza de Sapium lateriflorum (Euphorbiaceae)*. Tesis de Químico, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Beutler, J., Ada, A., McCloud, T., & Cragg, G. (1989). Distribution of phorol ester bioactivity in the Euphorbiaceae. *En: Phytother. Res.* , 26, 188-192.
- Billmeyer, F. (2004). *Ciencia de los polímeros*. Barcelona, España: Reverté.
- Branco, A., & Pizzolatti, G. (2002). CGAR e CGAR-em na análise dos constituintes químicos isolados do extracto hexanico. *En: Quim. Nova* , 25 (1), 15-19.
- Brooks, G., Butel, J., & Morse, S. (2005). *Microbiología médica* (18a ed.). México: Manual Moderno.
- Burbano, A. (2011). *Técnicas Espectroscópicas*. Recuperado el 18 de Marzo de 2013, de http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/aurbano/determinacion_estructural/rmn/rmn_tema3.pdf
- Burger, W. (1995). Family 113 Euphorbiaceae. *En: Fieldiana. Bot.* , 1-169.
- Carrere, R. (Diciembre de 1990). *El bosque natural uruguayo: utilización tradicional y usos alternativos*. Recuperado el 29 de Enero de 2013, de <http://www.guayubira.org.uy/monte/Ciedur7iii.html>
- Cava, A., Jongh, D., Johnson, C., Lebel, N., & Stevens, C. (1971). *Química orgánica* (2a ed.). Barcelona, España: Reverté.
- Chife, C. (2005). Garantía y control de calidad de materias primas vegetales para fines farmacéuticos. *En: LabCiencia* , 4 (8), 24-26.
- Coll, J., & Bowden, B. (2005). *Aplication of chromatography and another metods* . Recuperado el 20 de Febrero de 2013, de <http://www.phytochemicals.info/>

- De Melo, A., Esser, H., & De Sales, M. (2013). New combinations in Pleradenophora (Euphorbiaceae s.s.). *En: Phytotaxa* , 81 (1), 33-37.
- Delfino, L. (Julio de 2005). *Flora mexicana*. Recuperado el Julio de 24 de 2012, de http://tecrenat.fcien.edu.uy/Cursos/reconcimiento_de_flora/para_las_presentaciones_grupales/Delfino-Masciadri-Figueredo2005_Guaranina_2.pdf
- Delgado, G., Hernández, Y., & Aguilar, M. (1994). Pentacyclic triterpenes from *Cnidoscolus multilobus*. *En: Planta Med.* , 60, 389-390.
- Dixon, R. (2001). Natural products and plant disease resistance. *En: Nature* , 411, 843-847.
- Duarte, N., Vargas, A., Cherepnev, G., Radics, R., Mólnar, J., & Ferreira, M. (2007). Euphorbiaceae. *En: Bioorg. Med. Chem.* (15), 546-554.
- Durst, H., & Gokel, G. (2007). *Química orgánica experimental*. España: Reverté.
- Espinosa, F., & Delgado, G. (1998). Relationship between ecology of plant defense and the prospection of secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application. *Rev. Latinoamer. Quím.* , 26 (13-29).
- Gaertner, M.; Müller, L.; Roos, J.; Cani, G.; Santos, A.; Niero, R.; Calixto, J.; Yunes, R.; Delle Monache, F.; Cechinel-Filho, V. (1999). Triterpenos analgésicos de *Sebastiania schottiana* raíces. *En: Phytomedicine* , 6 (1), 41-44.
- Goel, G., Makkar, H., Francis, G., & Becker, K. (2007). Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *En: J. Toxicol.* , 26, 279-288.
- Gómez, R. (2006). Aislamiento de la morfina. 200 años de un descubrimiento fundamental para la química moderna. *En: Anales de la Real Sociedad Española de Química* (2), 45-53.
- Grandi, B., Vivot, E., Muñoz, J., Marino, V., & Ferraro, G. (11 de Febrero de 2010). *Compuestos aislados de Sebastiania commersoniana*. Recuperado el 29 de Enero de 2013, de www.idecefyn.com.ar/clf12002/archivos/108_FerraroG_R.doc
- Haene, E., & Aparicio, G. (2004). *Cien árboles argentinos*. Buenos Aires, Argentina: Albatros.
- Halaweish, F., Kronberg, S., Hubert, M., & Rice, J. (2002). Toxic and aversive diterpenes of *Euphorbia esula*. *En: J. Chem. Ecol.* , 28, 1599-1611.
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona, España: Reverté.
- Hnatyszyn, O., Juárez, S., Ouviaña, A., Martino, V., Zacchino, S., & Ferraro, S. (2007). Phytochemical analysis and antifungal evaluation. *En: Pharmaceutical Biology* , 45 (5), 404-406.
- Jasbbi, A. (2006). Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia*. *En: Iran Phytochemistry* , 67, 1977-1984.

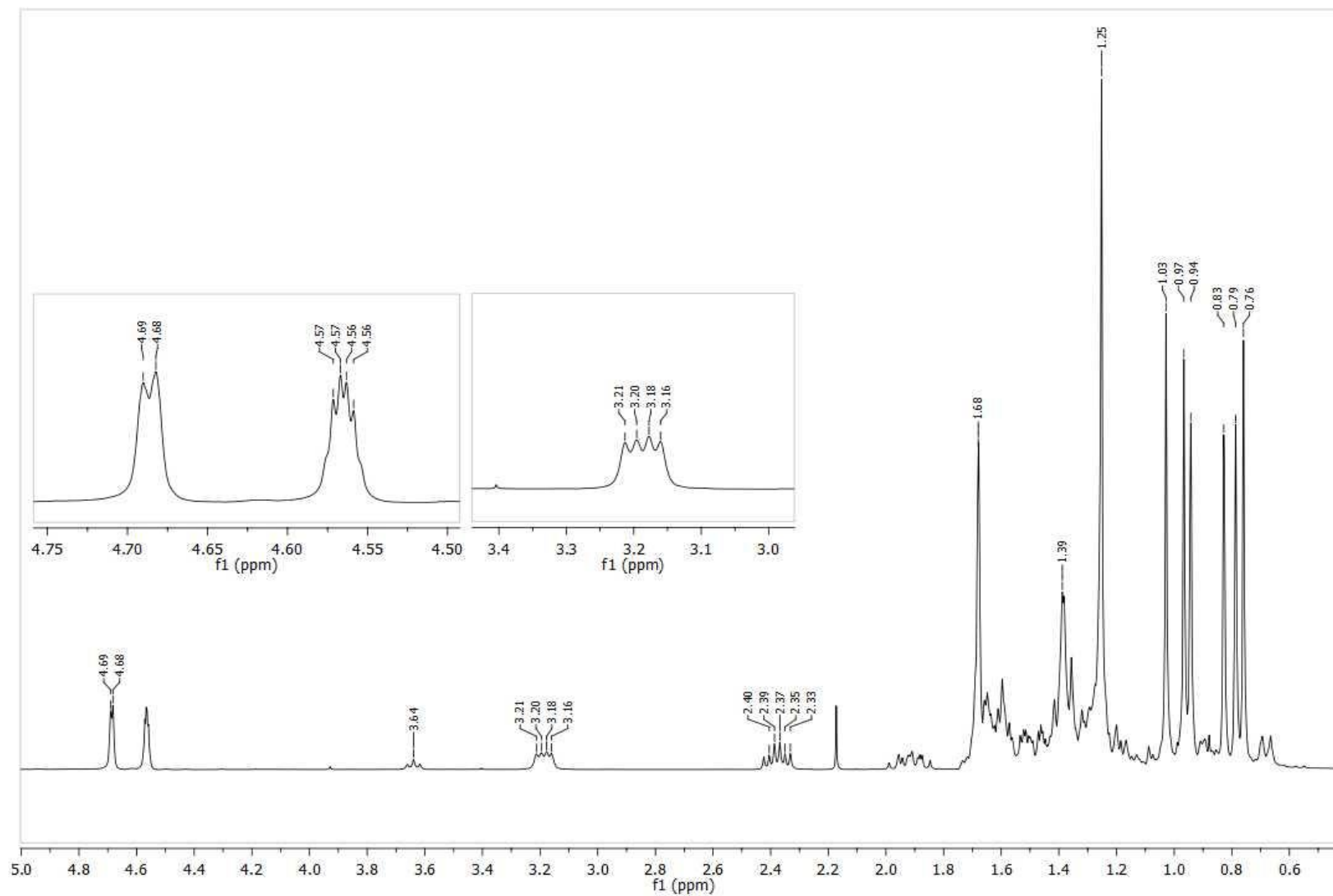
- Kirby, J., Nishimoto, M., Park, J., Withers, S., Nowroozi, F., Behrendt, D., y otros. (2010). Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cereviceae*. *En: Phytochemistry* , 71, 1466-1473.
- Lima, M., Lima, J., Arriaga, A., & Neto, M. (2009). Constituyentes químicos de *Sebastiania macrocarpa* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). *En: Quím. Nova* , 32 (2), 348-353.
- Lima, O.; Morais, V.; Gomes, S.; Folho, V.; Miguel, O.; Yunes, R. (1995). Preliminary evaluation of antifungal activity of xanthoxyline. *En: Acta Farm. Bonaerense* , 14 (3), 213-216.
- López, M., Triana, J., Pérez, F., & Torres, M. (Febrero de 2005). *Métodos de identificación de metabolitos secundarios*. Recuperado el 15 de Marzo de 2013, de <http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>
- Macías, M., Hernández, B., Jiménez, M., Cruz, R., & Anaya, A. (2007). Pentacyclic triterpenes with selective bioactivity from *Sebastiania adenophora* leaves, Euphorbiaceae. *En: J Chem Ecol* , 33, 147-156.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N., Mesa, M., & Galeano, E. (2008). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Colombia: Udea.
- Martínez, E. *Sebastiania longicuspis*. Herbario Nacional MEXU, México.
- McCarthy, S. (2008). *Plant-soil feedbacks in temperate and tropical forest*. Michigan: ProQuest LLC.
- McMurry, J. (2008). *Química orgánica* (7a ed.). México: Thomson/Brooks/Cole.
- Nee, M. (10 de Enero de 2012). *Euphorbiaceae. The New York Botanical Garden*. Recuperado el 12 de Mayo de 2013, de <http://www.nybg.org/search/?search=sebastiania>
- Penna, C., Marino, S., Vivot, E., Cruaños, C., Muñoz, J., Cruaños, J., y otros. (2001). Antimicrobial activity of argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology* , 77 (1), 37-40.
- Phillipson, J. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *En: Phytochemistry* , 56, 237-243.
- Prieto, J., Patiño, O., Lesmes, L., Lozano, M., & Cuca, L. (2011). Estudio fitoquímico de hojas de *Uncaria guianensis* y evaluación de actividad antibacteriana. *En: Acta Amaz.* , 41 (2), 303-310.
- Primo, E. (2007). *Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria*. Barcelona, España: Reverté.

- Reyes, B. (2012). *Nuevo triterpenos de Garcia parviflora (Euphorbiaceae)*. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Ríos, E. (2009). *Cromatografía*. Recuperado el 15 de Mayo de 2013, de <http://www.slideshare.net/honey61187/crotagrafa>
- Rivero, R., Rodríguez, E., Menéndez, R., Fernández, J., Barrio, G., & González, M. (2005). Influencia del tipo de secado en la molienda de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* , 7 (1), 32-38.
- Roe, F., & Peirce, W. (1961). Tumor promotion by Euphorbia latices. *En: Cancer reseach* , 338.
- Rowshanul, M., Nikkon, F., & Rahman, M. (2007). Isolation of stigmasterol and B-sitosterol from methanolic extract of root bark of Calotropis gigantea (Linn). *Pakistan Journal of Biological Sciences* , 10, 4174-4176.
- Sahelian, R. (2012). *Stigmasterol*. Recuperado el 12 de Abril de 2013, de <http://www.raysahelian.com/stigmasterol.html>
- Salamanca, G. (2002). *La familia Euphorbiaceae como condición promisorio para la obtención de metabolito secundarios*. Ibagué: Departamento de Química. Universidad de Tolima.
- Sauer, U., & Eikmanns, B. (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *En: FEMS Microbio Rev* , 29 (4), 765-794.
- Skoog, D. (2001). *Fundamentos de química analítica* (5a ed.). España: Reverté.
- Sousa, G., Duarte, L., Alcantara, A., & Silva, G. (2012). New triterpenes from Maytenus robusta: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. *En: Molecules* , 17, 13439-13456.
- Sree, S. (2010). Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: Sebastiana chamalea Muell. *En: The Bioscan* , 173-175.
- Steinmann, V. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *En: Act. Bot. Mex.* , 61, 61-93.
- Swain, T. (1973). Chemistry in evolution and systematics. *En: Butterworth* , 1, 1-2.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 1). Castelló de la Plana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I.
- Uquillas, O. (Octubre de 2011). *Cromatografía*. Recuperado el 3 de Marzo de 2013, de http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIPA/CAPITULO%20N%BA%2011.pdf

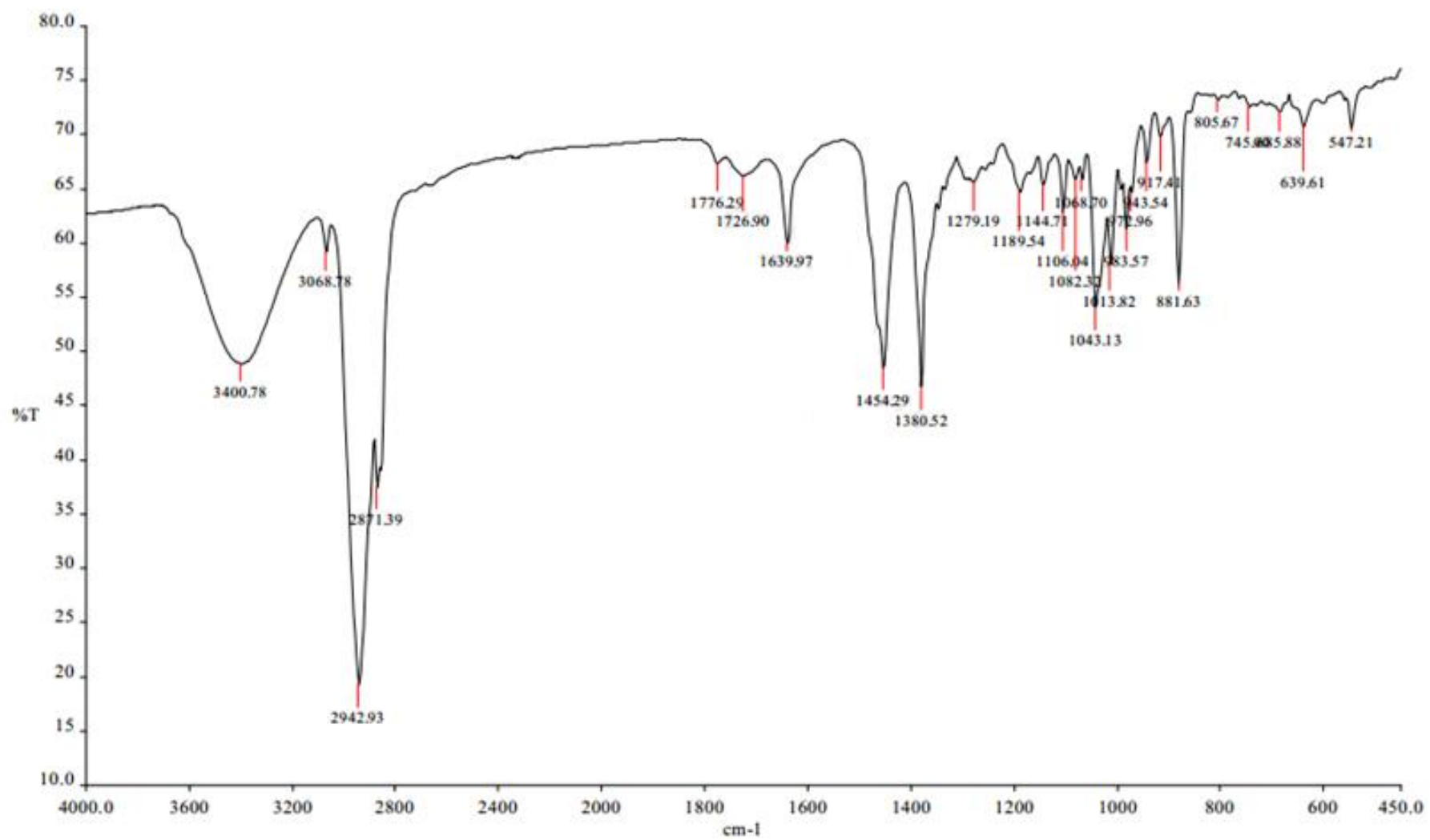
- USP 30. (2007). *Pharmacopeia. Botanical extract*.
- Vallalodid, U. (2012). *Metodos analíticos de metabolitos secundarios de plantas*. Recuperado el 3 de Marzo de 2013, de https://www5.uva.es/guia_docente/uploads/2012/470/45820/1/Documento23.pdf
- Vaz, A., Costa, R., Melo, A., Oliva, M., Santana, L., Silva-Lucca, R., y otros. (2010). Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated. *En: Food Chemistry*, 119, 1507–1513.
- Wal, P., Wal, A., Sharma, G., & Rai, K. (2011). Biological activities of lupeol. *En: Syst. Rev. Pharm.*, 2, 96-103.
- Webster, G. L. (1994). Systematics of the Euphorbiaceae. *En: Annals of the Missouri Botanical Garden*, 81, 33-144. .
- Zhen, L., Wei, J., & Z.-W. D.-H. (2010). Assignment of the absolute stereochemistry of an unusual diterpenoid. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 19, 387-392.

ANEXO I.

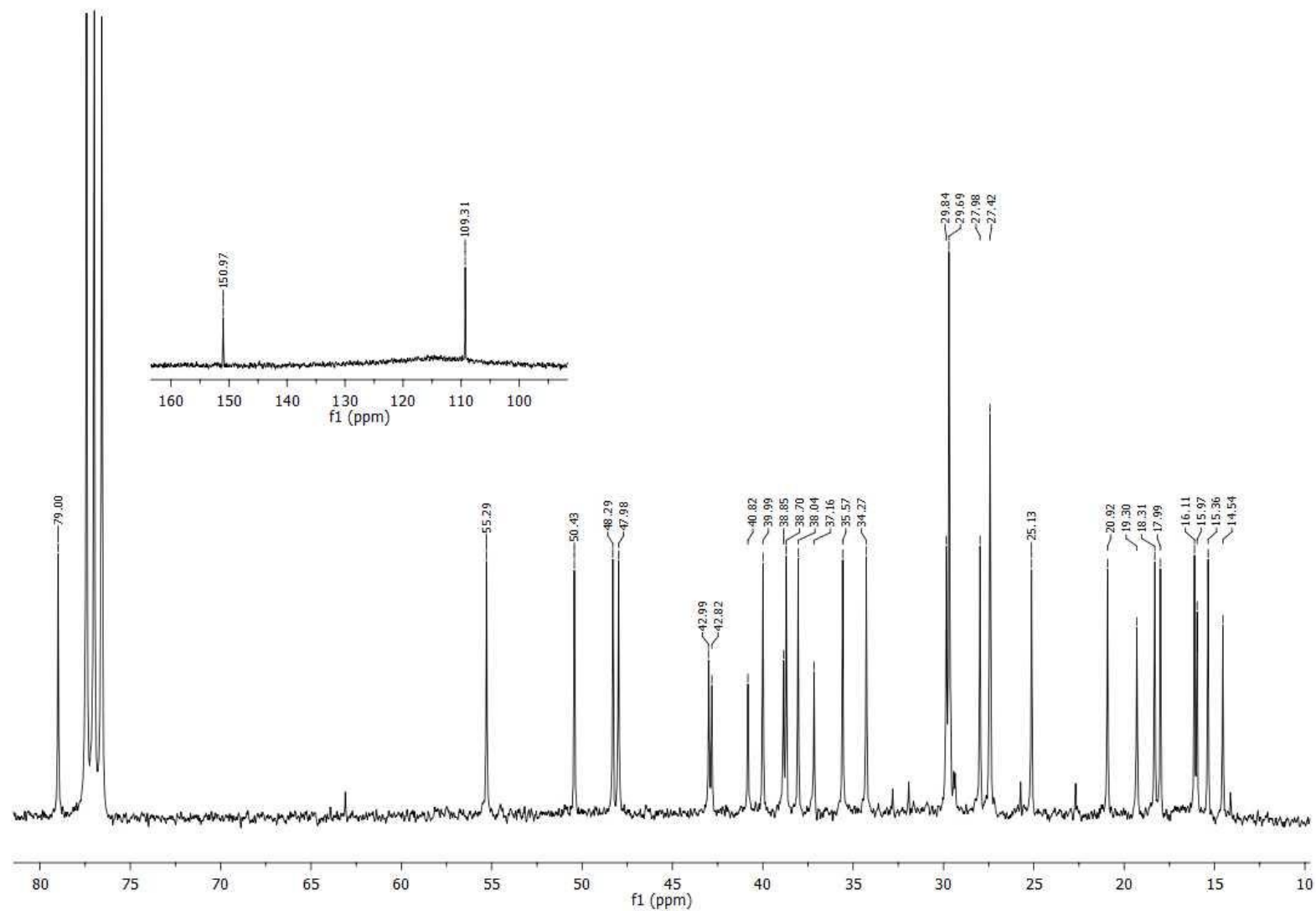
**Espectros de los compuestos aislados de los tallos del
extracto diclorometano-metanol 1:1 de *Sebastiania*
*longicuspis***



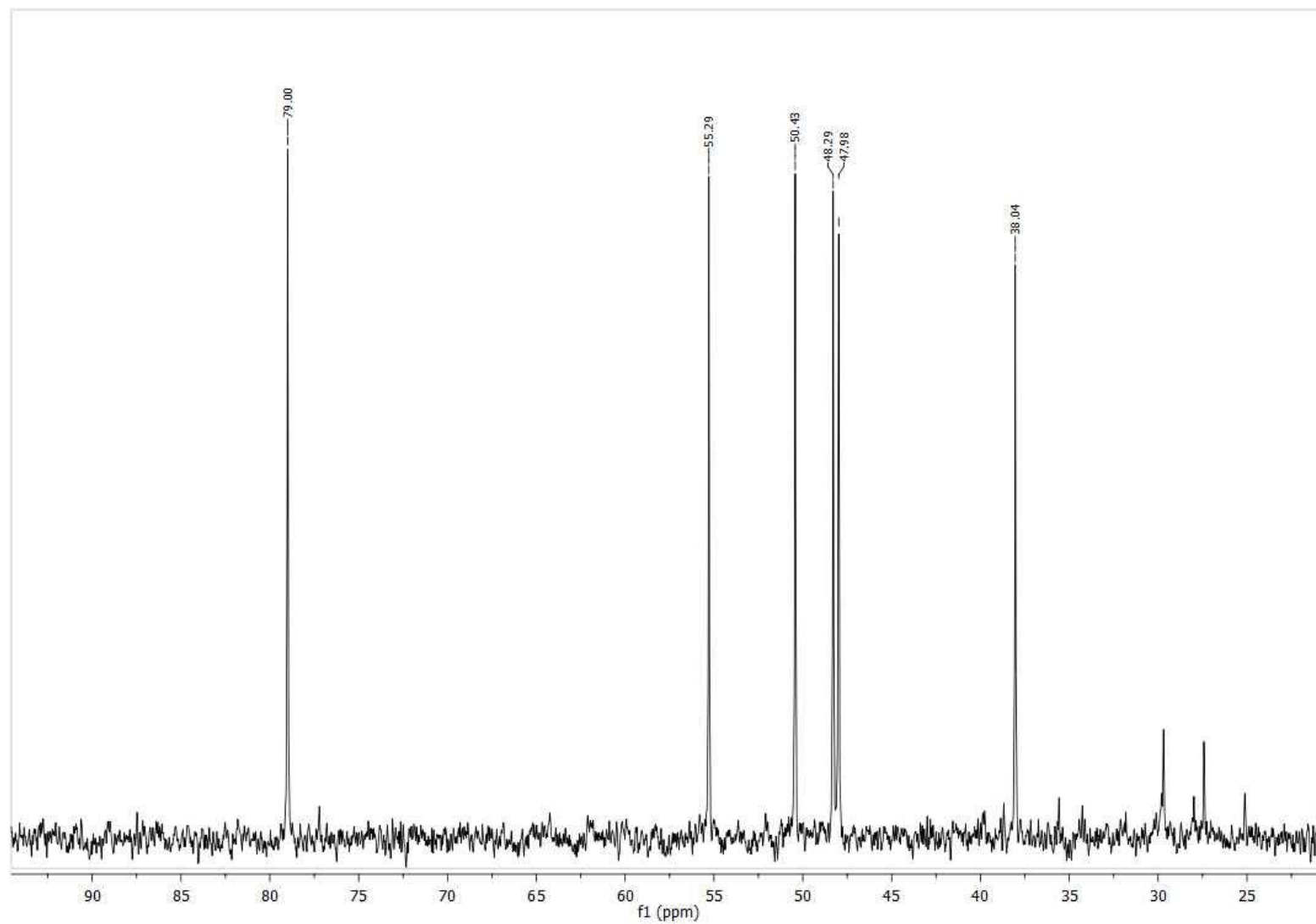
Espectro 1. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 19 β -lupeol



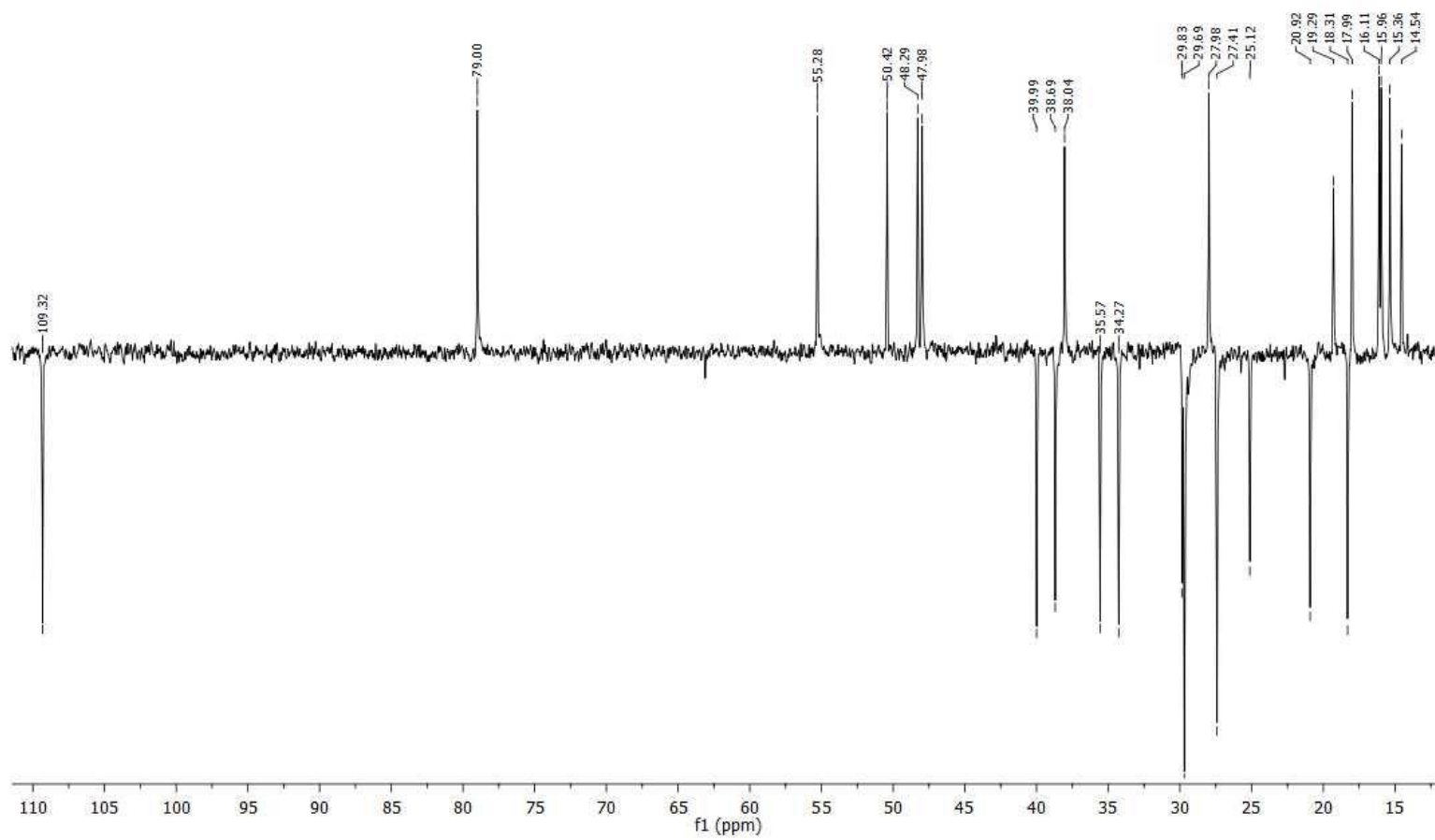
Espectro 2. IR de 19 β -lupeol



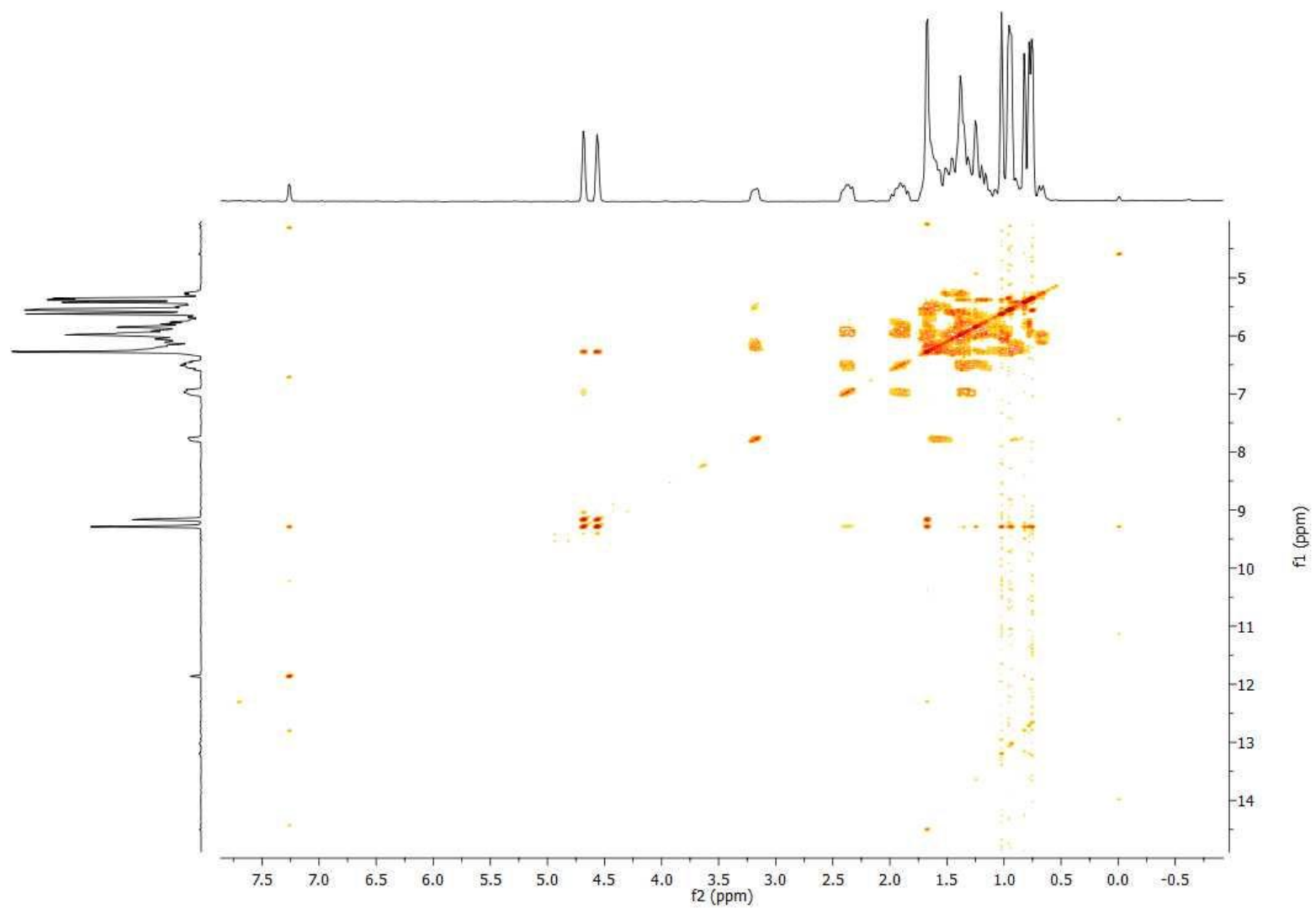
Espectro 3. RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) de 19 β -lupeol



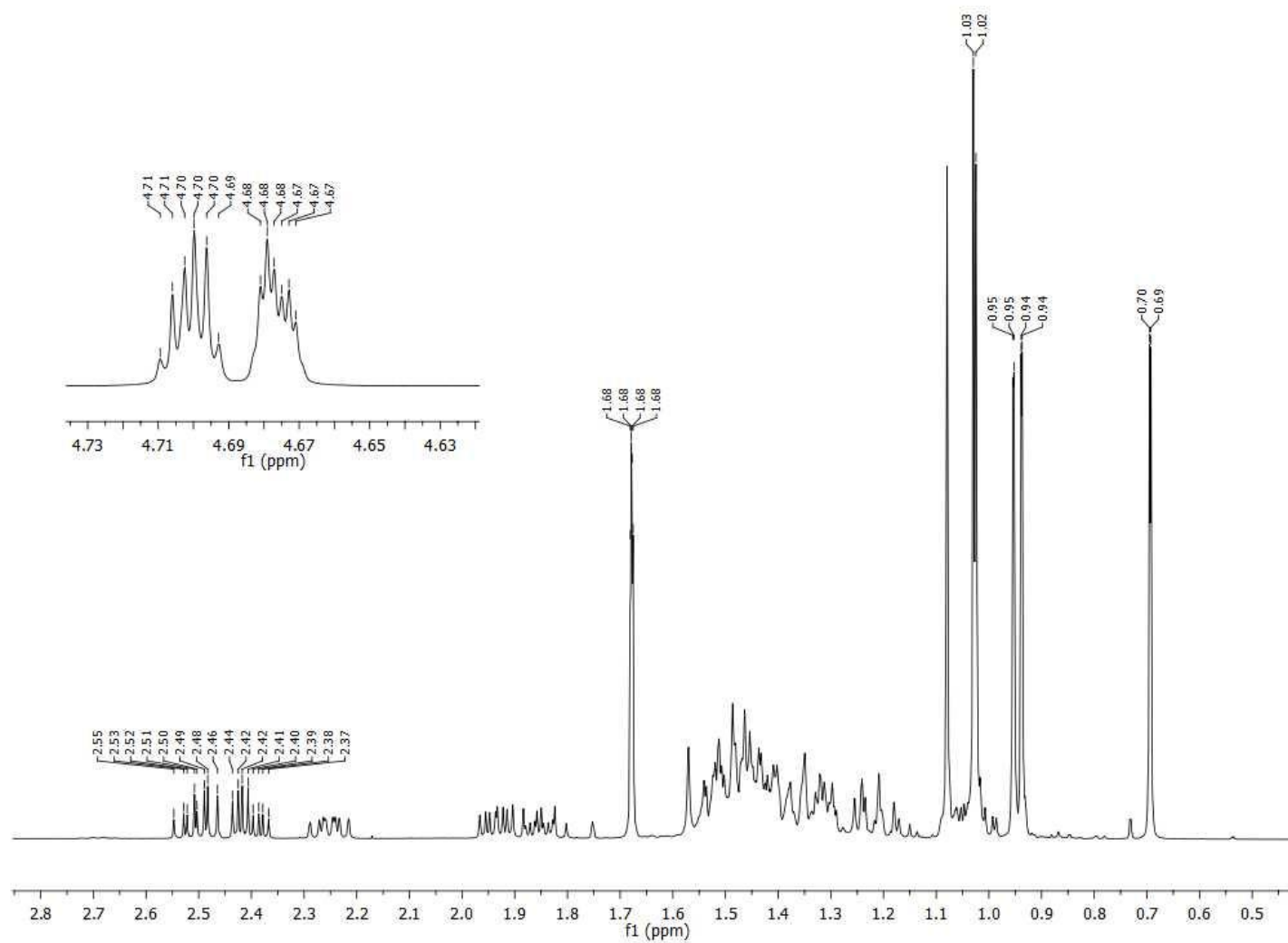
Espectro 4. RMN DEPT 90 (300 MHz, CDCl₃) de 19 β-lupeol



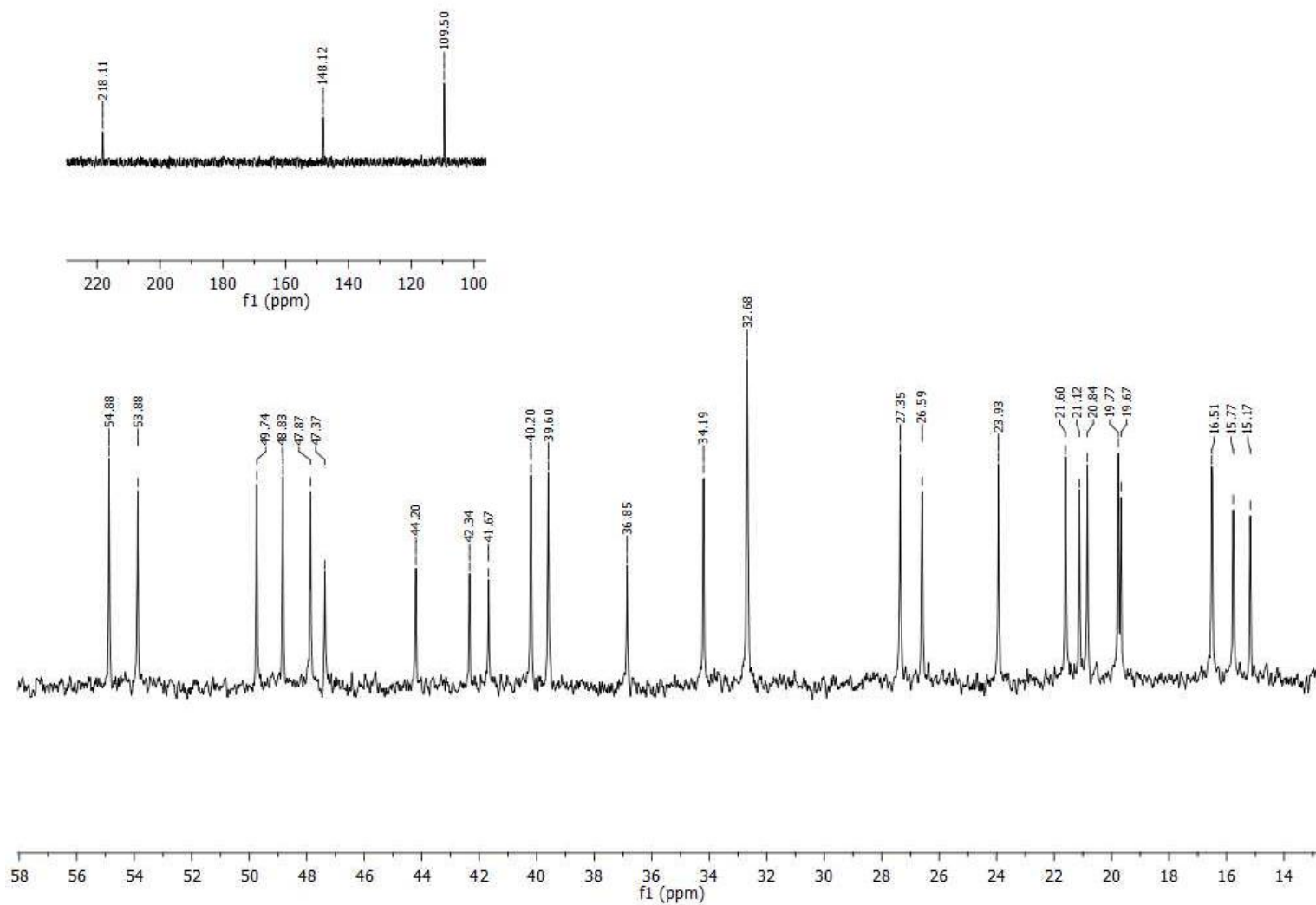
Espectro 5. RMN DEPT 135 (300 MHz, CDCl₃) de 19 β -lupeol



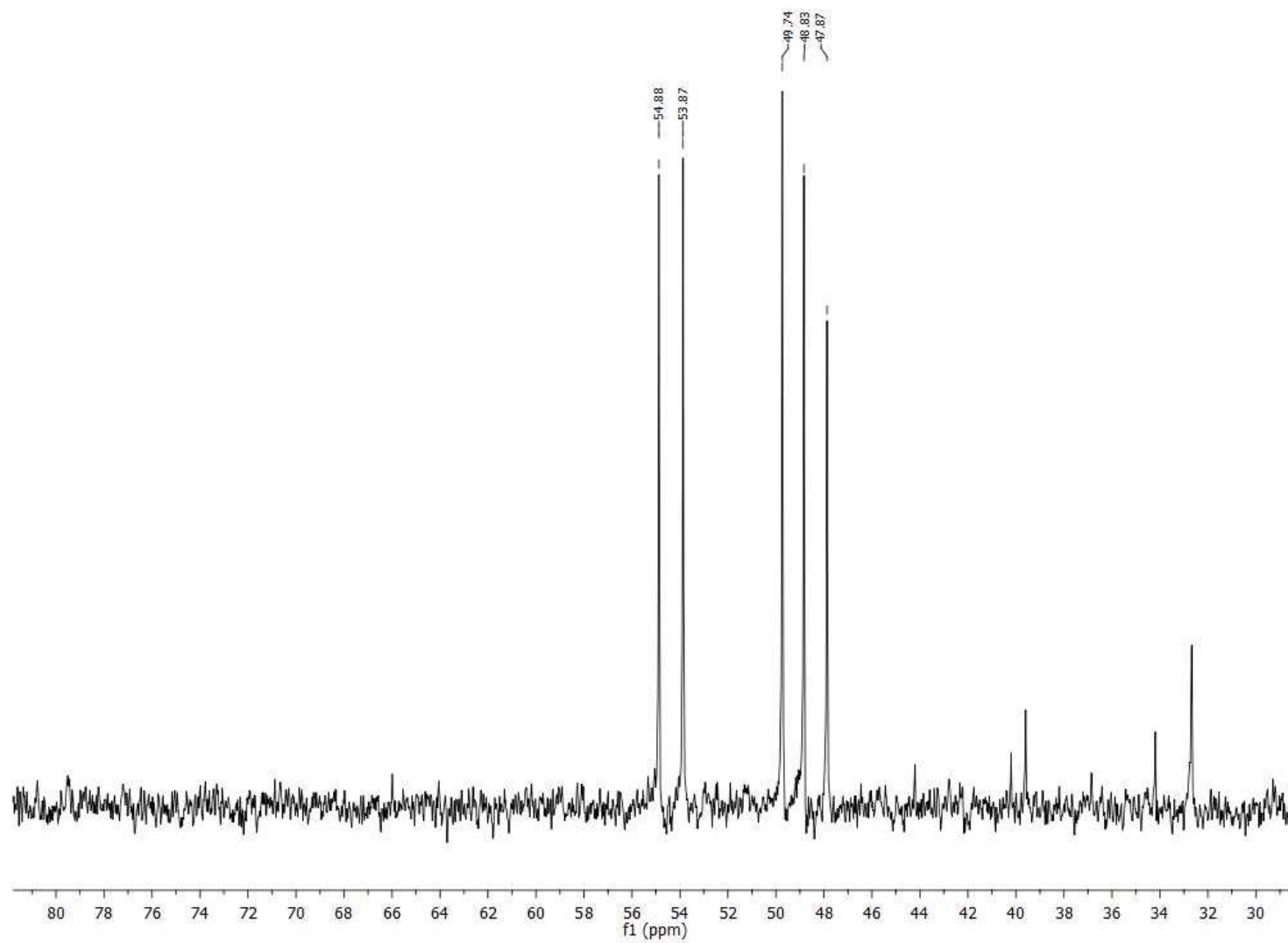
Espectro 6. COSY (500 MHz, CDCl₃) de 19 β -lupeol



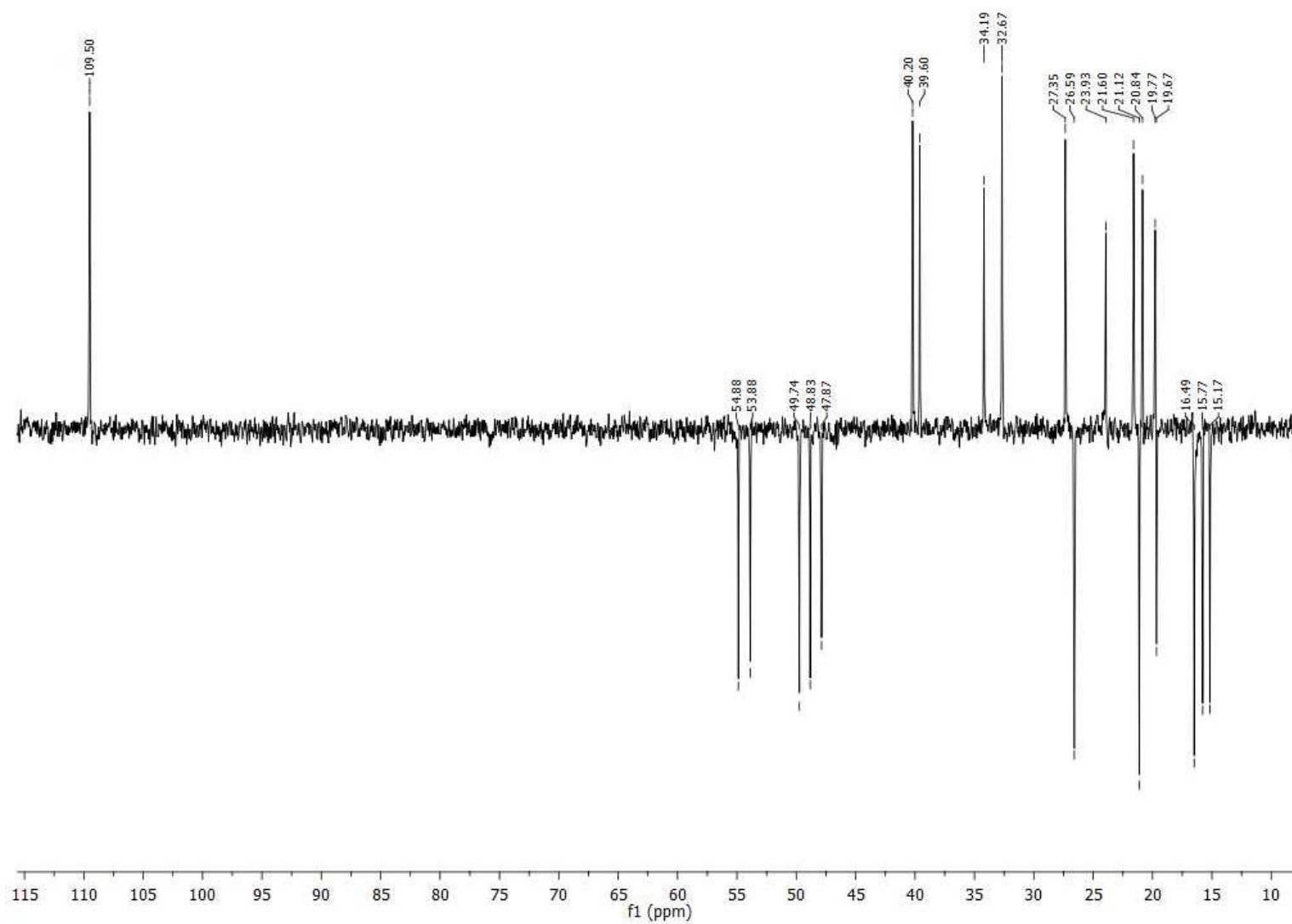
Espectro 7. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene (32)



Espectro 8. RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) de 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene (32)



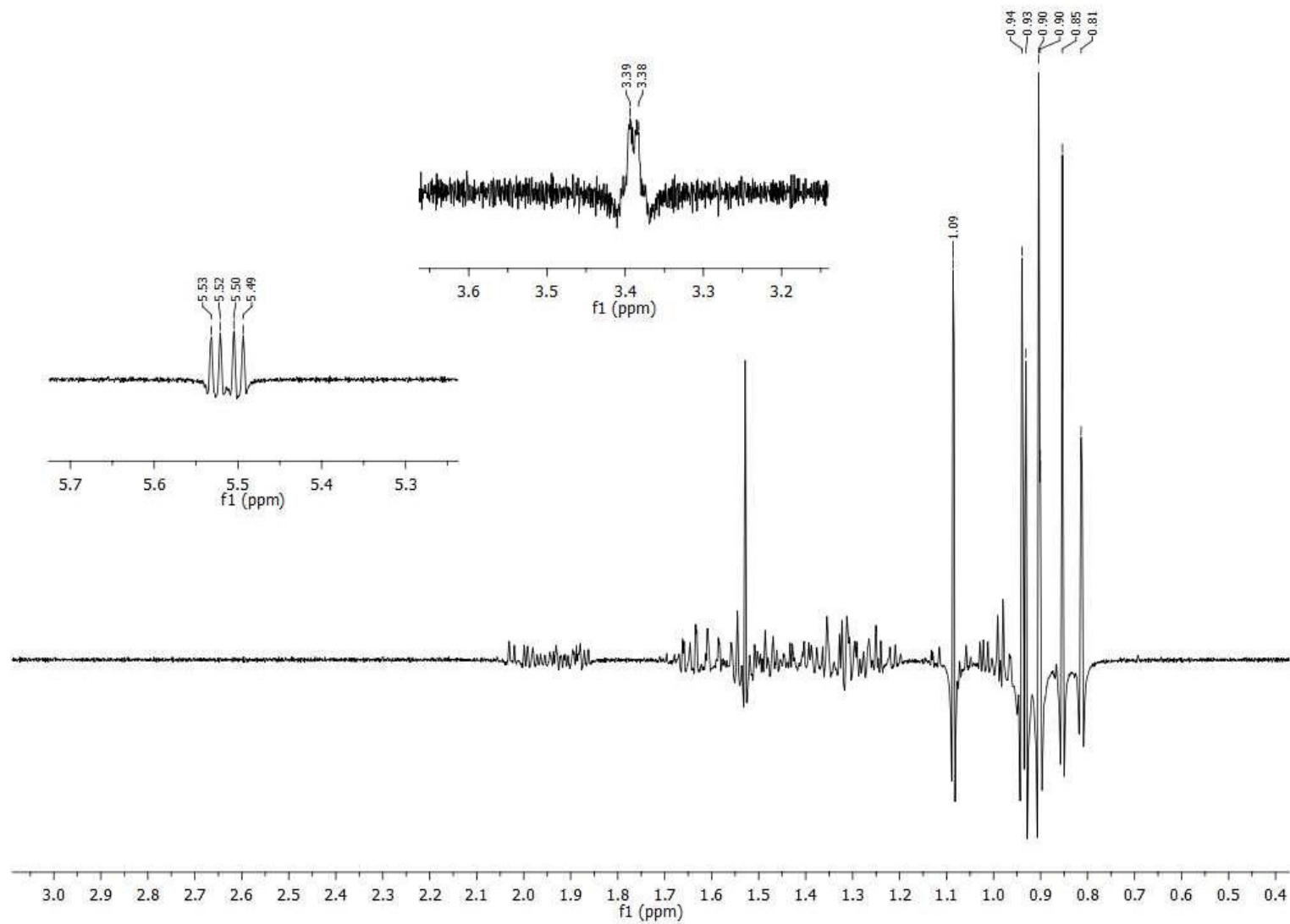
Espectro 9. DEPT 90 (400 MHz, CDCl₃) de 3-oxo-21 β -H-hop-22(29)-ene (32)



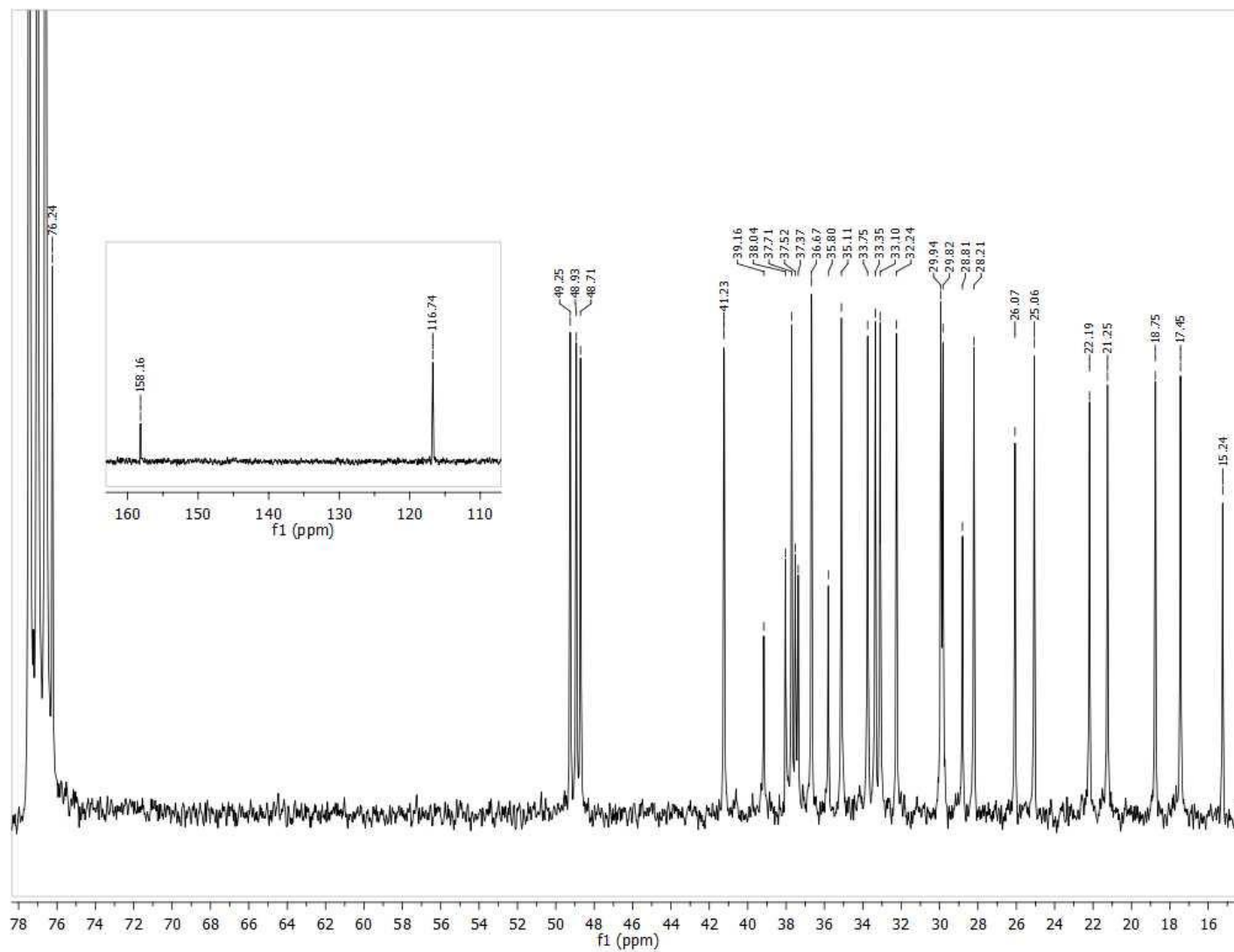
Espectro 10. DEPT 135 (400 MHz, CDCl₃) de 3-oxo-21β-H-hop-22(29)-ene (32)

ANEXO II.

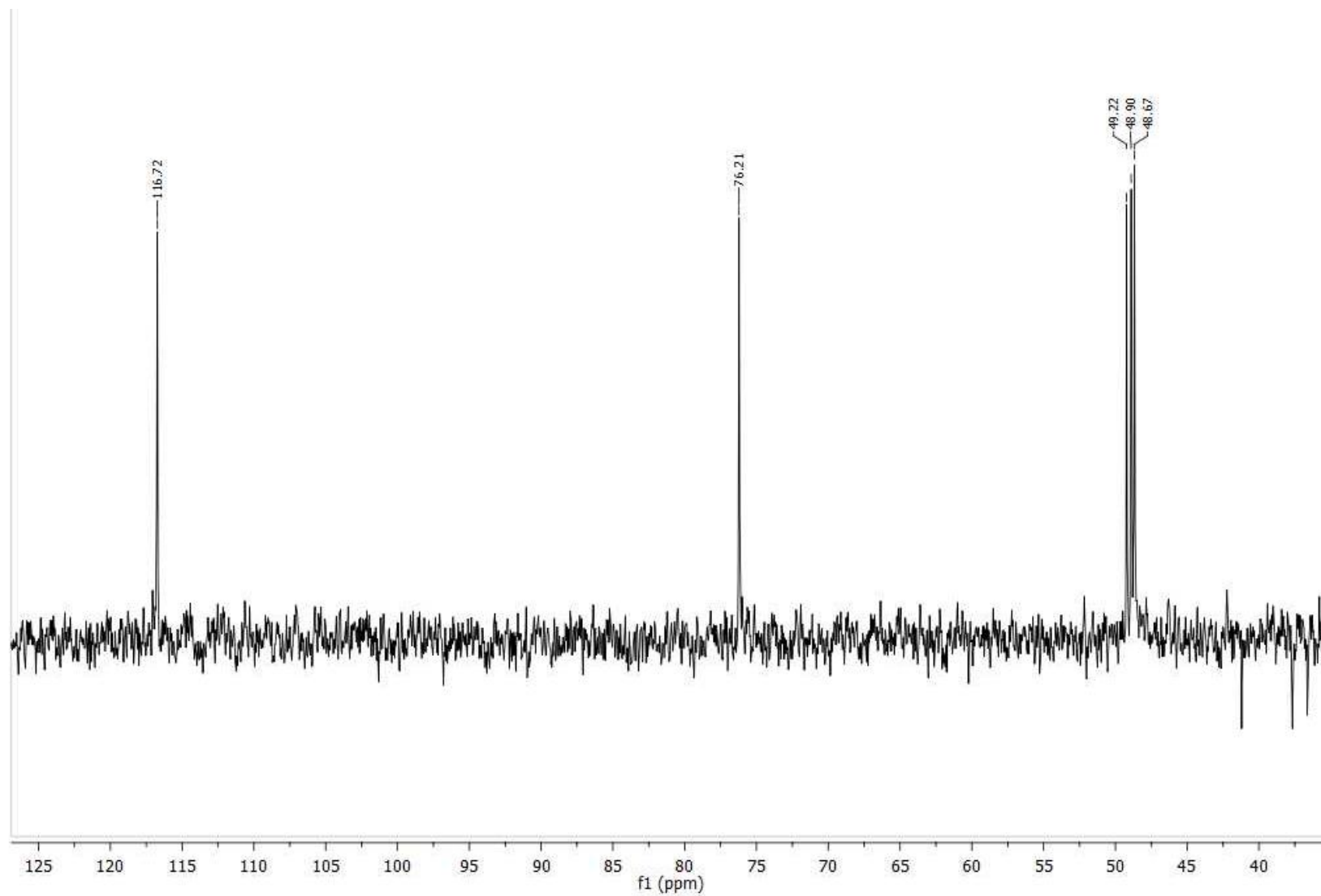
**Espectros de los compuestos aislados de las hojas del
extracto diclorometano-metanol 1:1 de *Sebastiania*
*longicuspis***



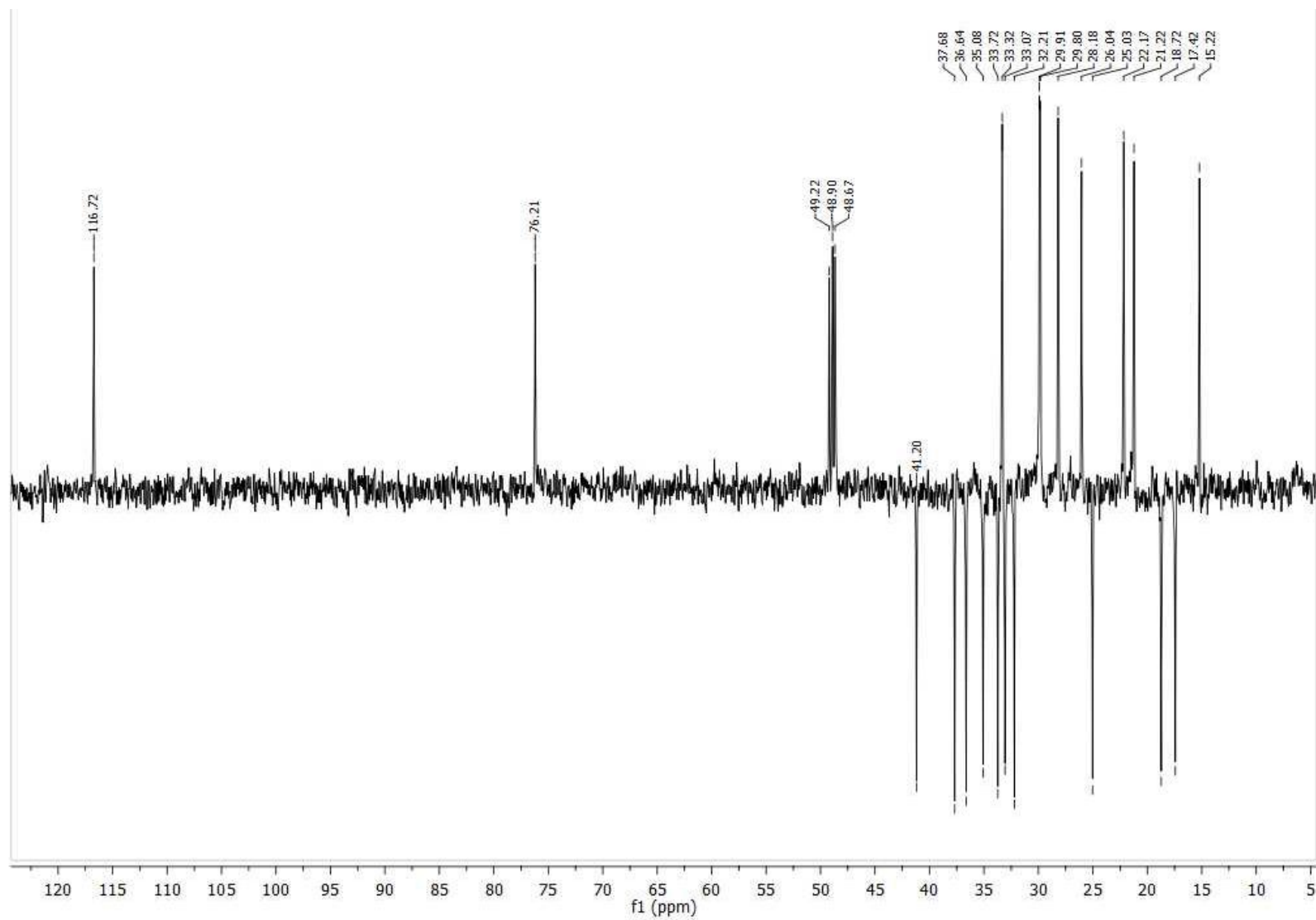
Espectro 11. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 3-epi-taraxerol



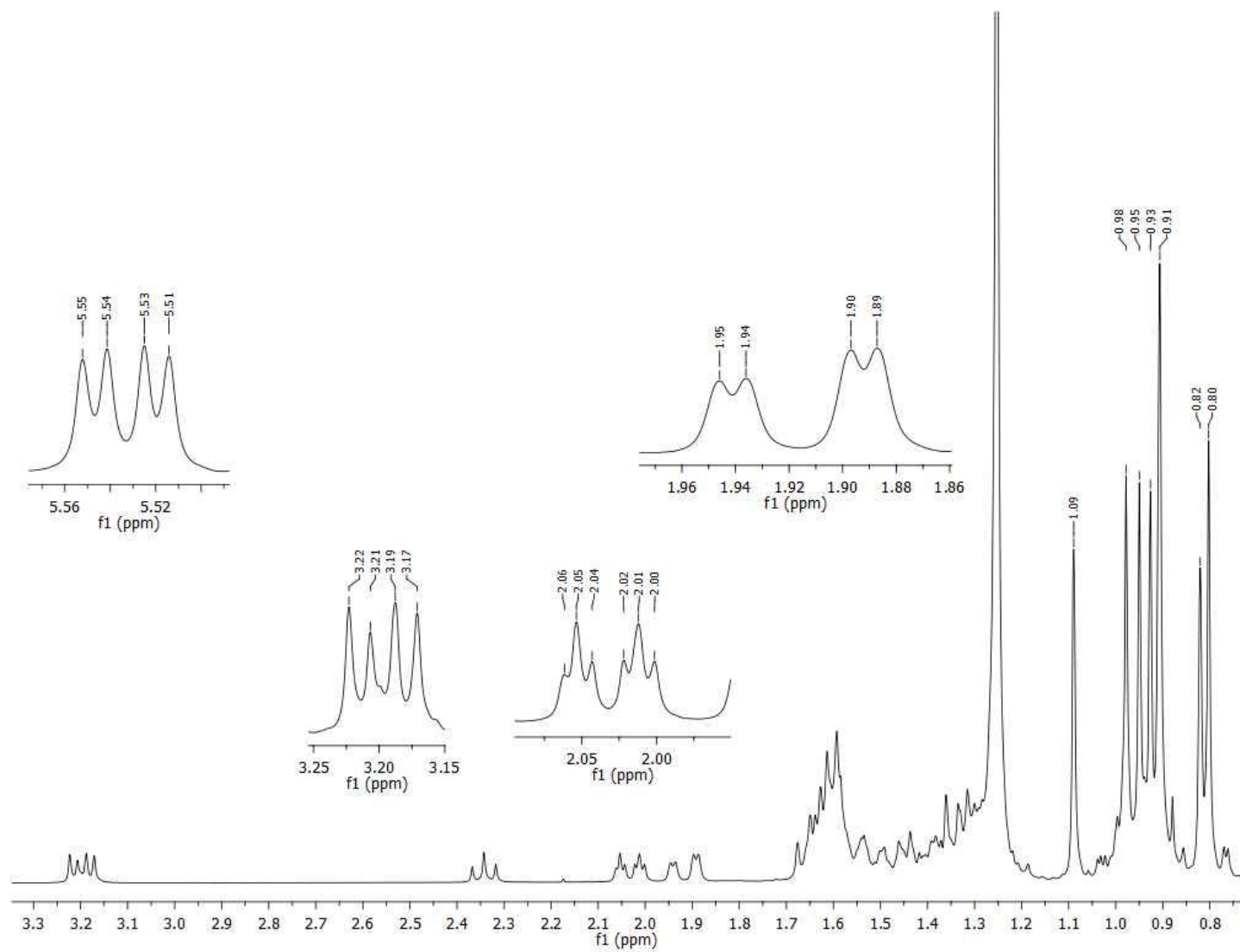
Espectro 12. RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) de 3-epi-taraxerol



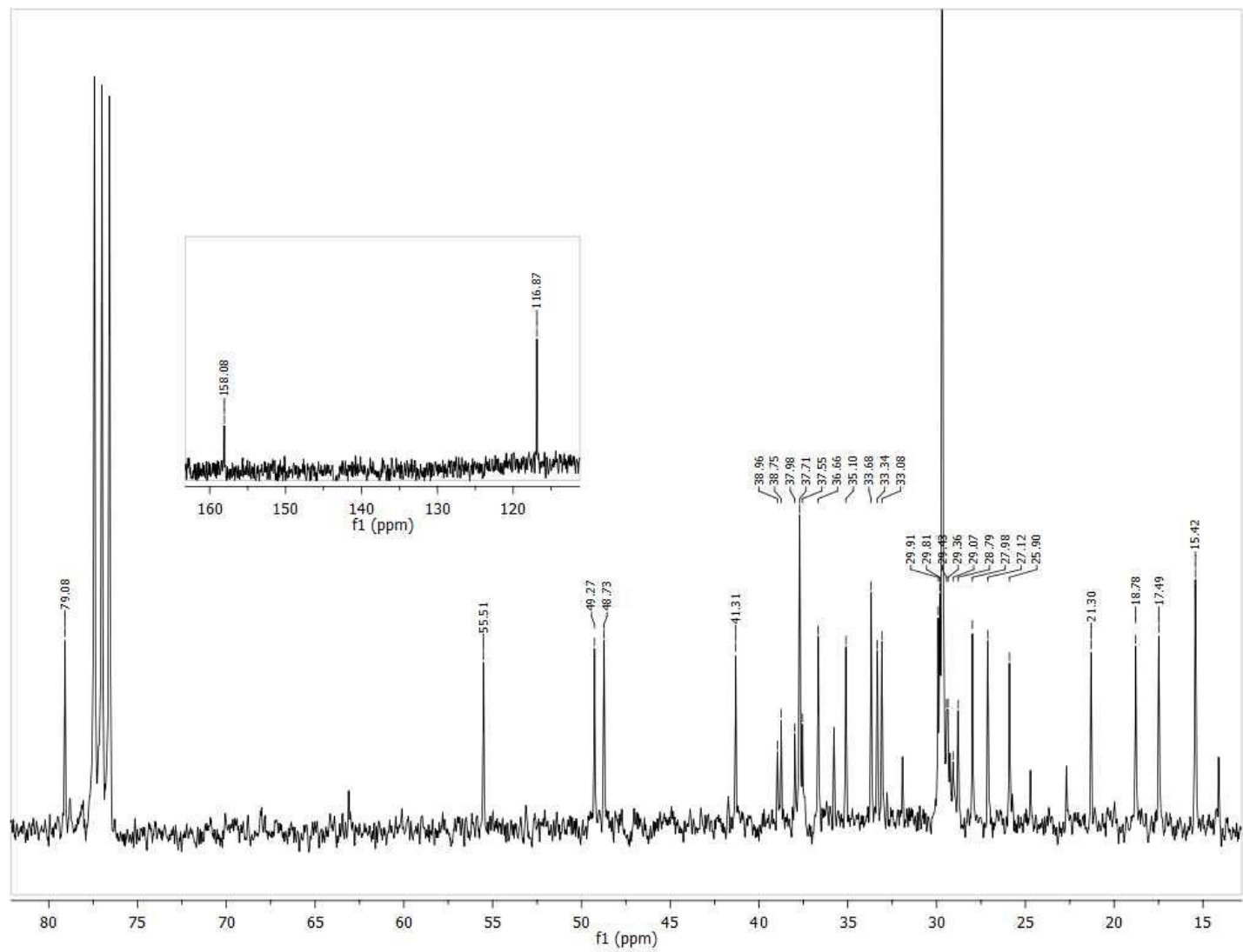
Espectro 13. DEPT 90 (500 MHz, CDCl₃) de 3-epi-taraxerol



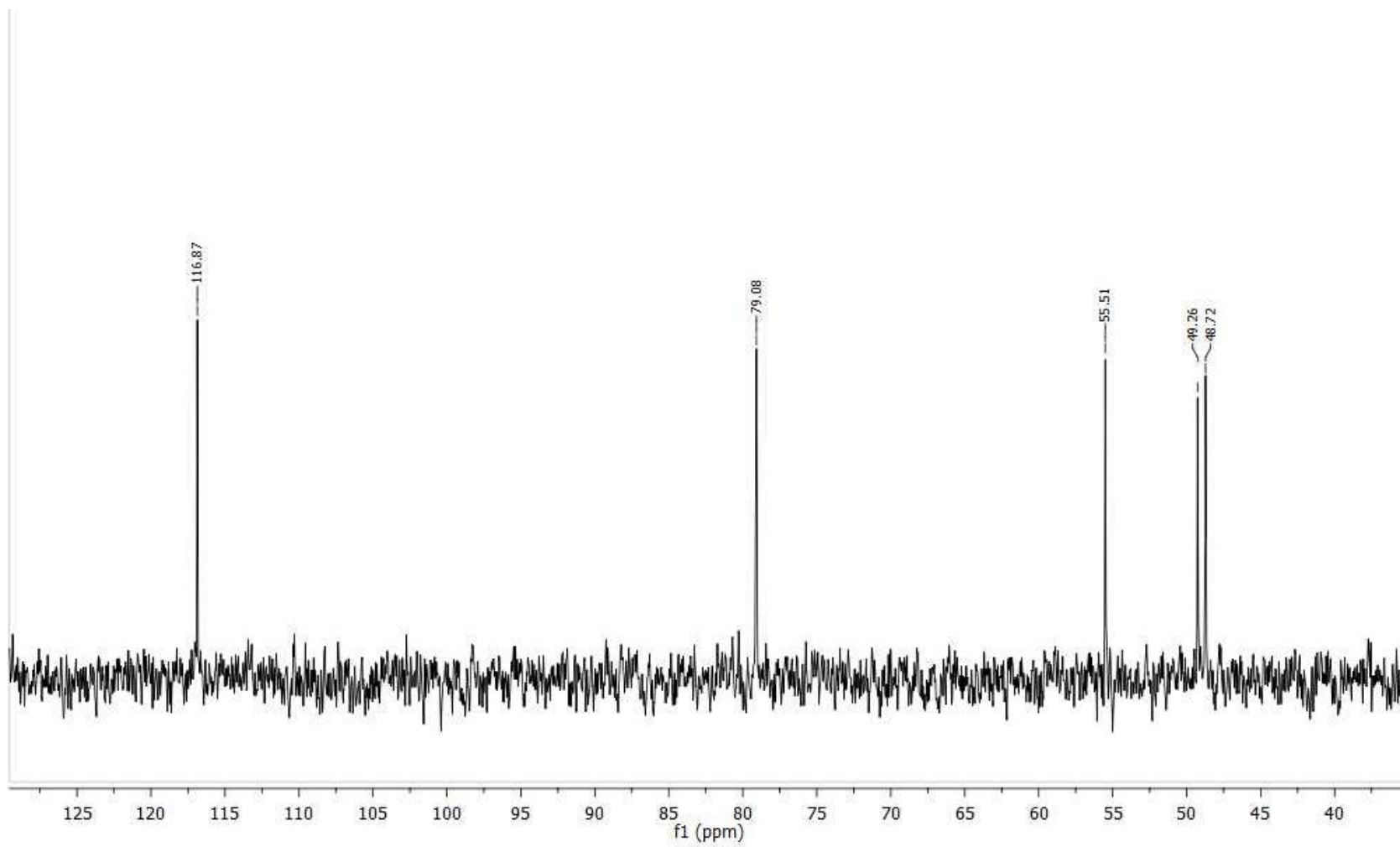
Espectro 14. DEPT 135 (500 MHz, CDCl₃) de 3-epi-taraxerol
122



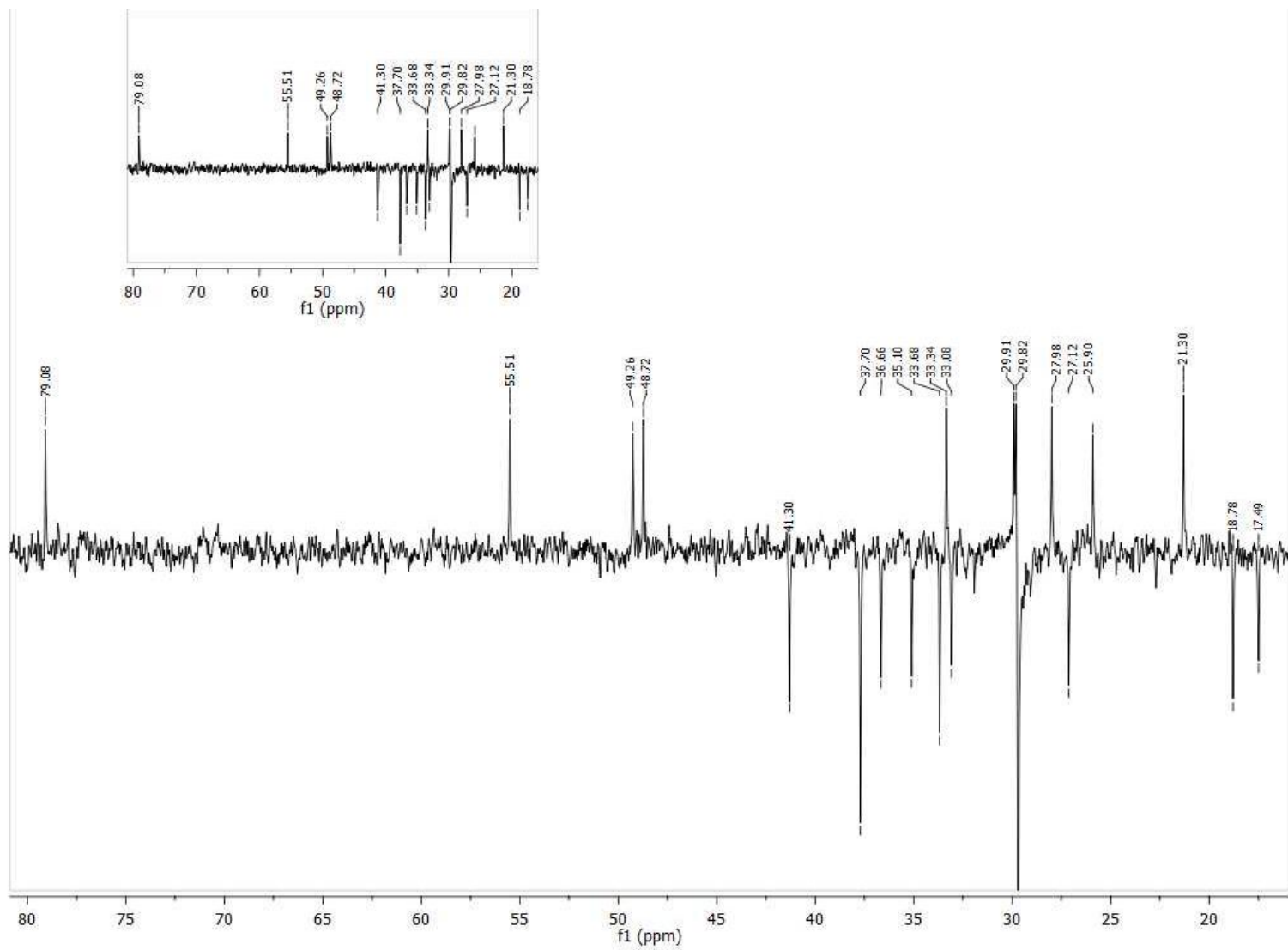
Espectro 15. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de taraxerol



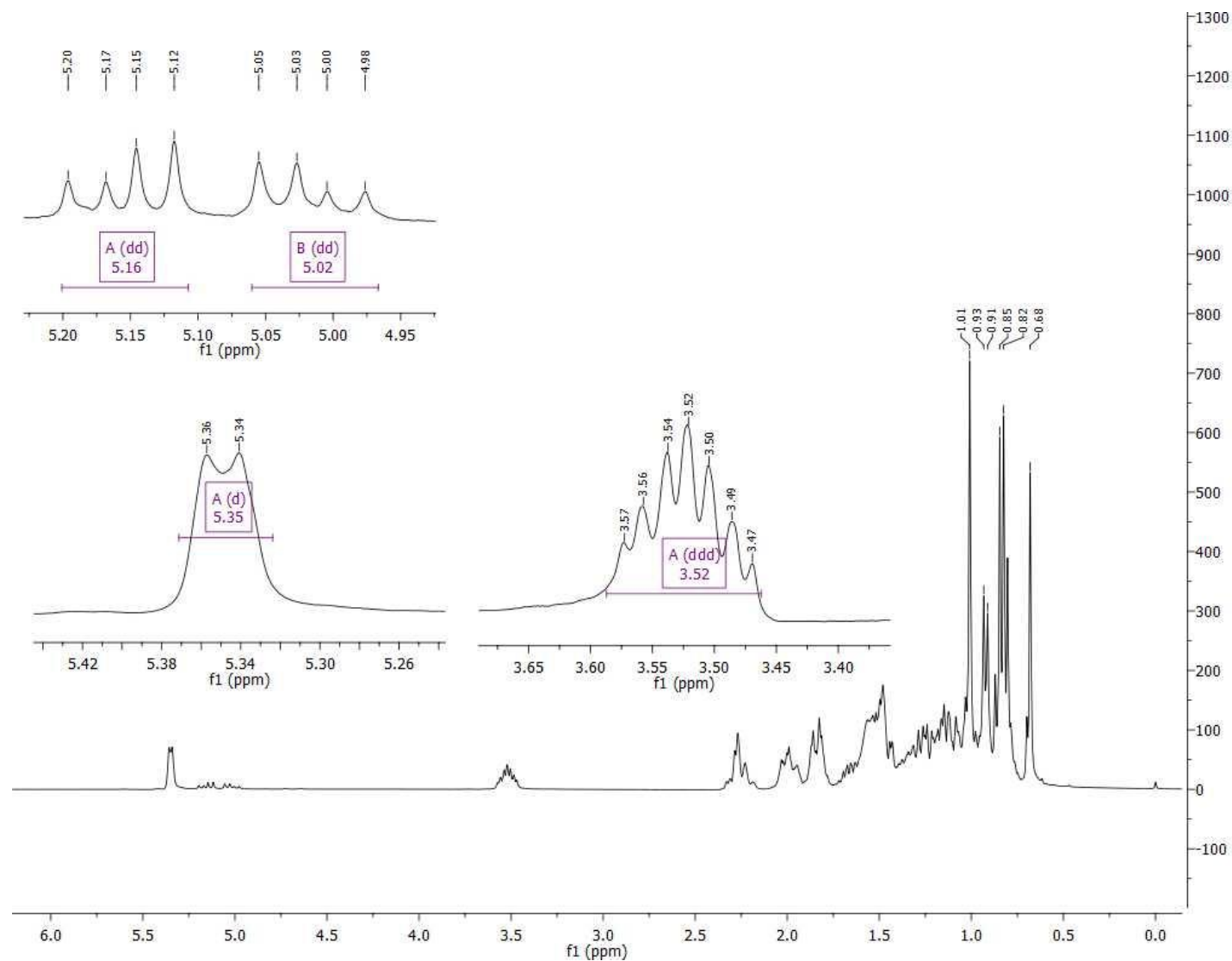
Espectro 16. RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de taraxerol



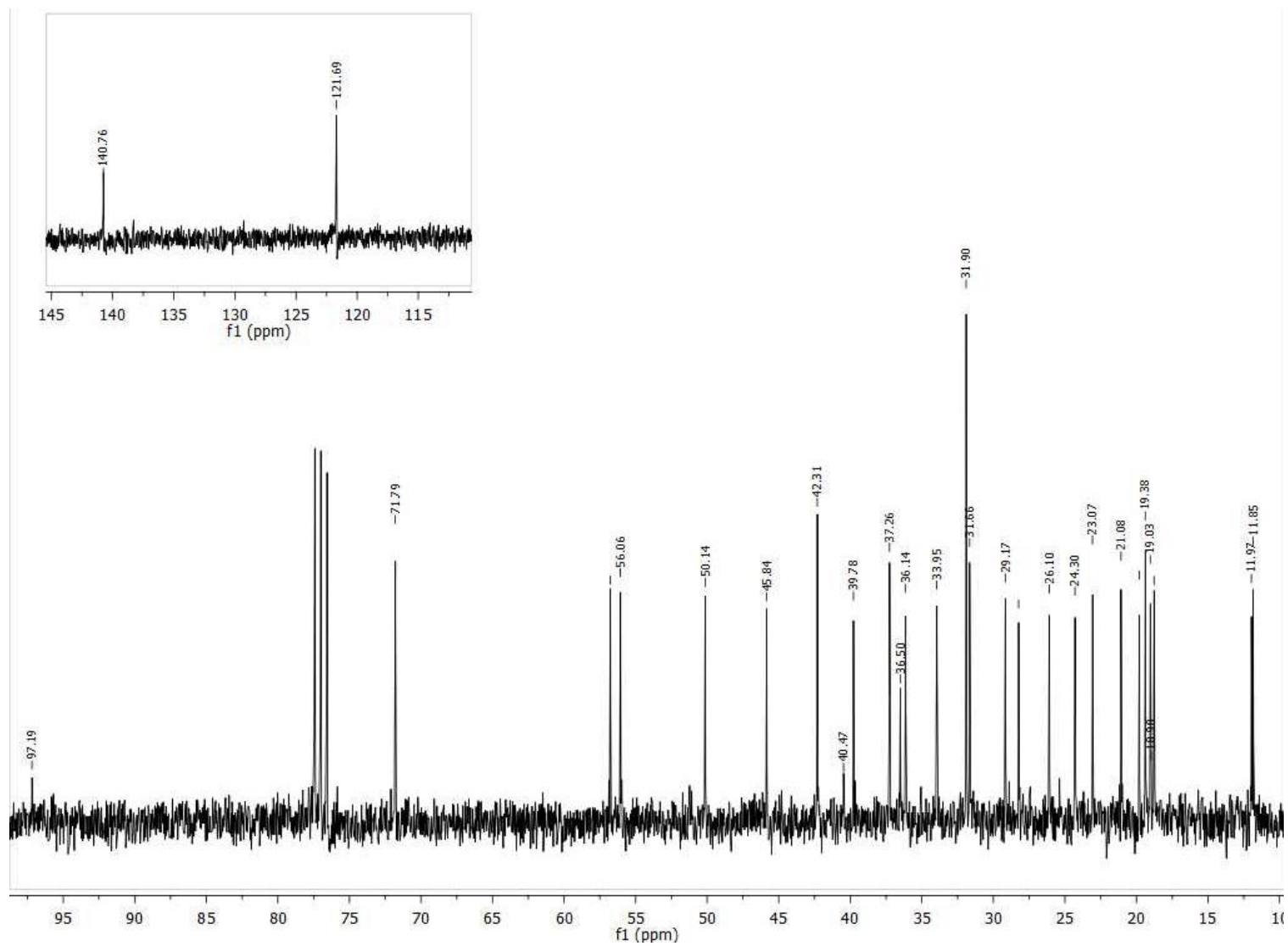
Espectro 17. DEPT 90 (500 MHz, CDCl₃) de taraxerol



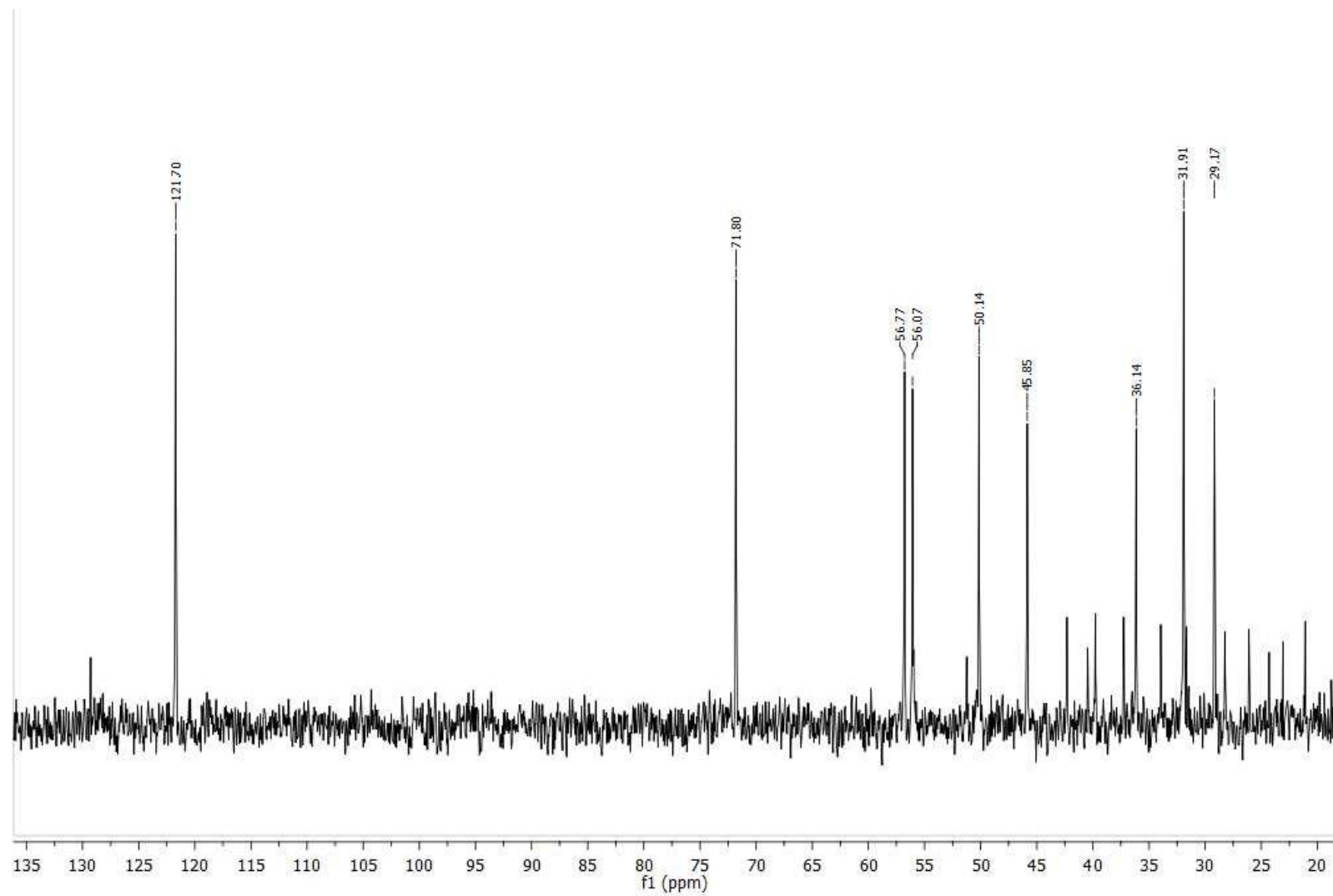
Espectro 18. DEPT 135 (500 MHz, CDCl₃) de Taraxerol



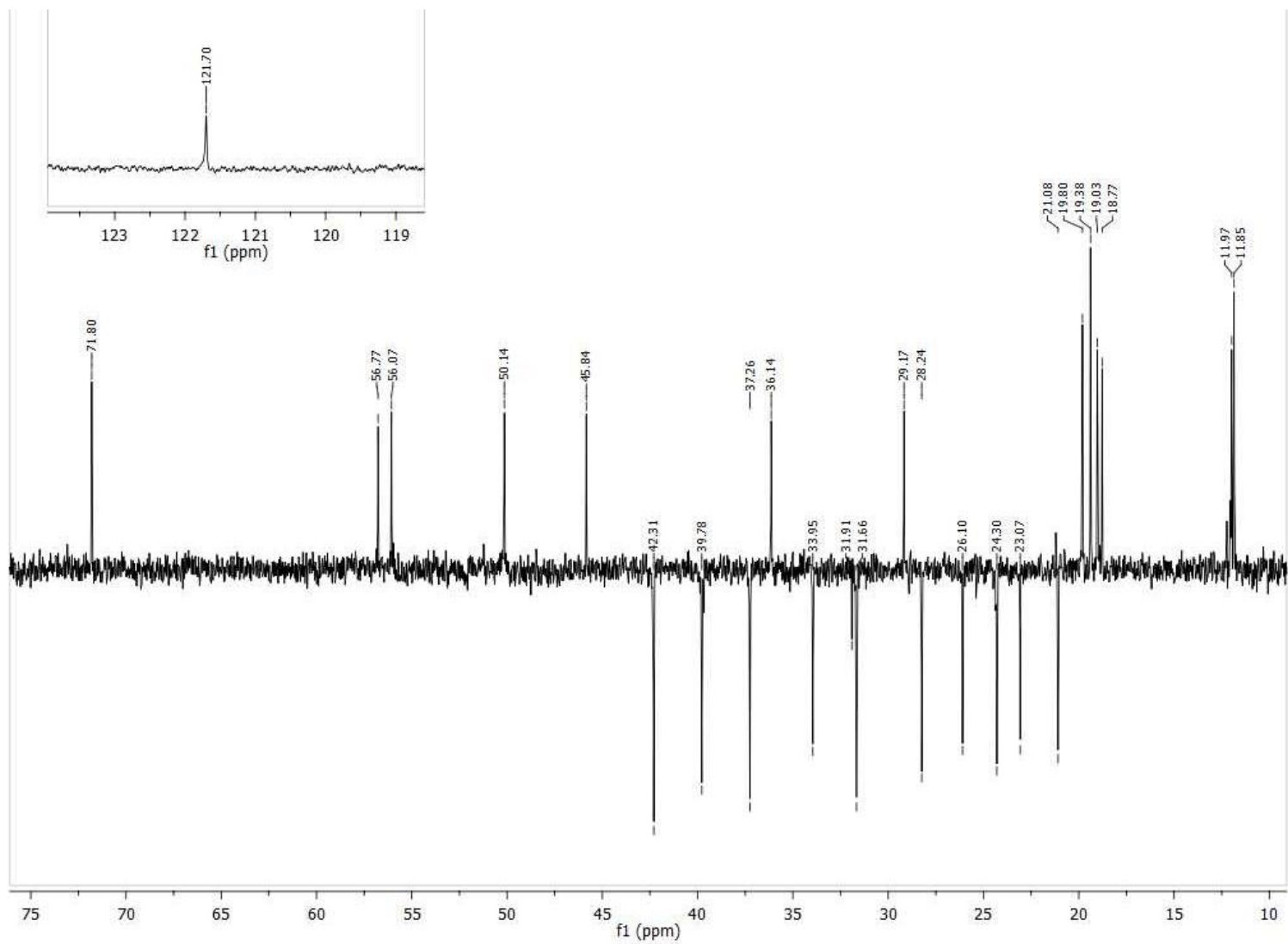
Espectro 19. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de β -sitosterol-Estigmasterol



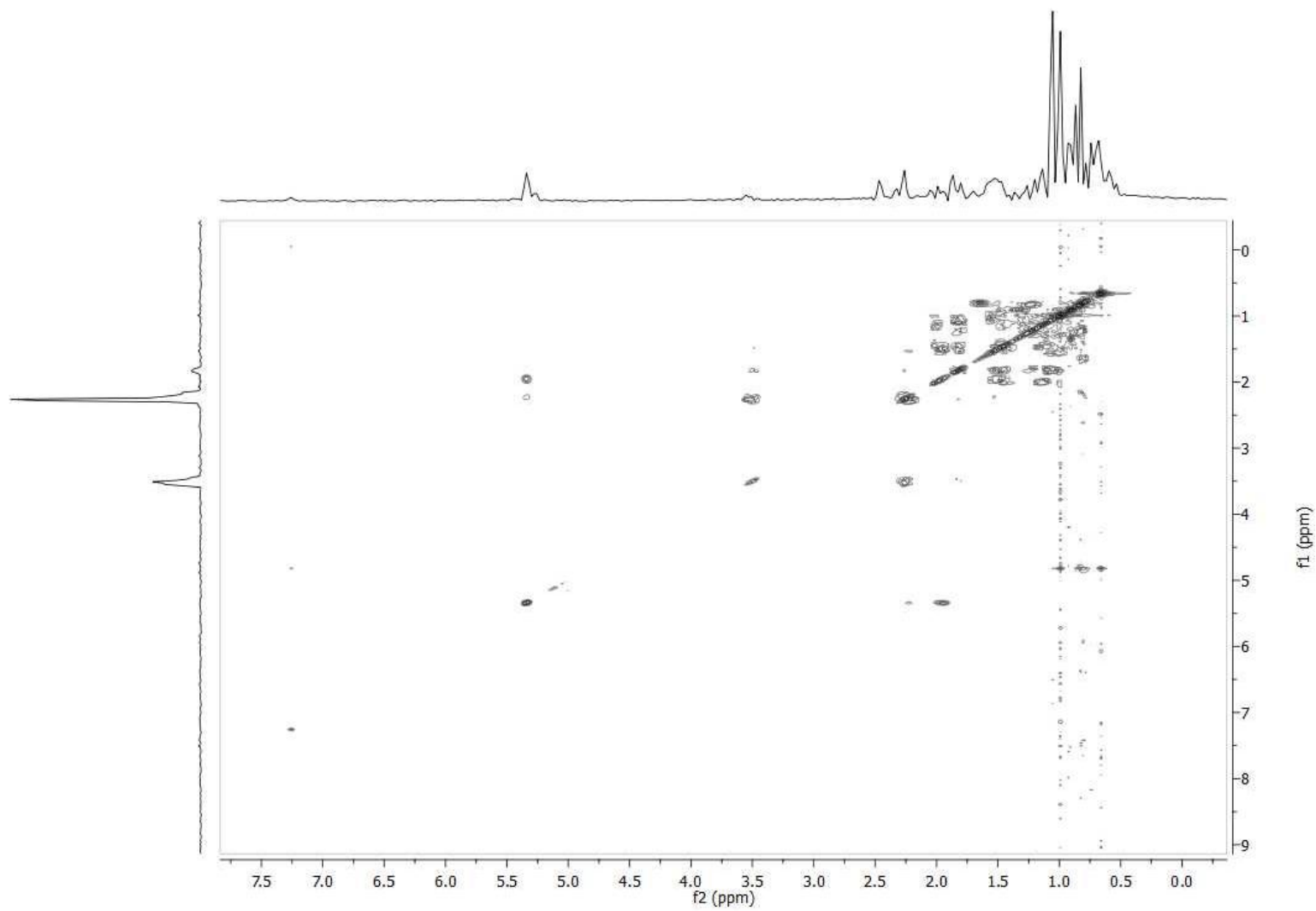
Espectro 20. RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de β - sitosterol-Estigmasterol



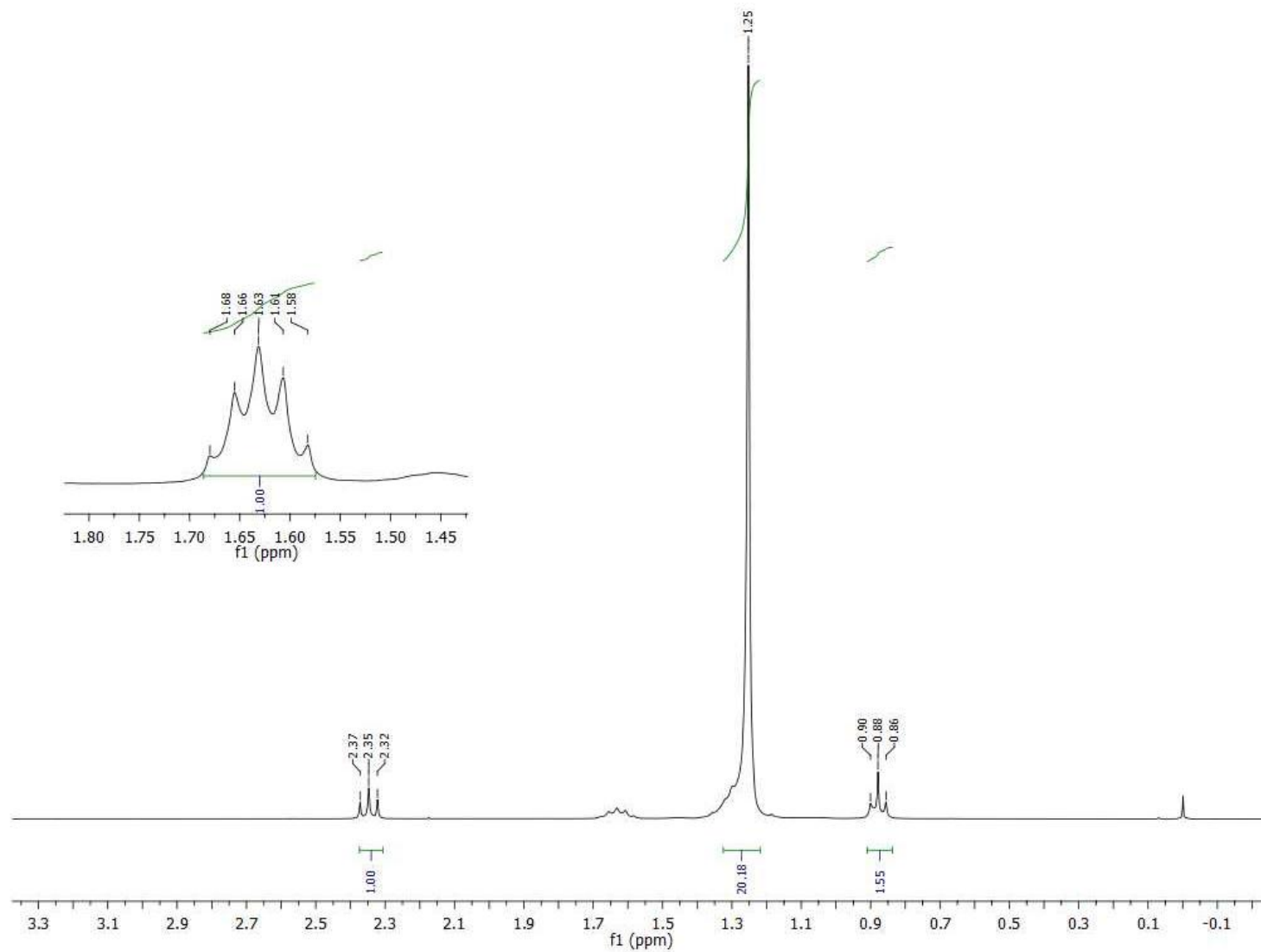
Espectro 21. DEPT 90 (500 MHz, CDCl₃) de β - sitosterol-Estigmasterol



Espectro 22. DEPT 135 (500 MHz, CDCl₃) de de β- sitosterol-Estigmaterol



Espectro 23. COSY (500 MHz, CDCl₃) de de β - sitosterol-Estigmasterol



Espectro 24. Espectro 18. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ácido lignocérico